

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BRUNA HELENA SILVA RENDALL ÉVORA

SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS E AOS BIOCIDAS CLOREXIDINA E CLORETO  
DE BENZALCÔNIO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

**NATAL  
2019**

BRUNA HELENA SILVA RENDALL ÉVORA

SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS E AOS BIOCIDAS CLOREXIDINA E CLORETO  
DE BENZALCÔNIO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Parasitária e Microbiológica.

Profa. Orientadora: Dra. Maria Celeste Nunes de Melo

NATAL  
2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson –  
Centro de Biociências - CB

Évora, Bruna Helena Silva Rendall.

Susceptibilidade aos antibióticos e aos biocidas clorexidina e cloreto de benzalcônio em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* / Bruna Helena Silva Rendall Évora. – Natal, 2019.

88 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Celeste Nunes de Melo.

1. *Acinetobacter baumannii* - Dissertação. 2. Multirresistência - Dissertação. 3. Biocidas - Dissertação. I. Melo, Maria Celeste Nunes de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 579.84

*“ O impossível não é um fato: é uma opinião. ”*

*Mário Sérgio Cortella*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter-me dado saúde e força para superar todas as dificuldades, principalmente a saudade da família e do meu querido país, Cabo Verde.

Aos meus pais, Henrique e Sandra, e a minha irmãzinha Érika, por todo amor incondicional, apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, e que apesar da distância, mantiveram sempre presentes na minha mente e no meu coração.

À minha querida família, que, mesmo há milhas de distância, demonstraram muito carinho e preocupação, que para mim foi muito importante

À Universidade Federal Rio Grande do Norte, pela oportunidade de realizar meus objetivos de vida acadêmica.

À minha orientadora, professora Maria Celeste, pelo empenho e dedicação prestado na elaboração deste trabalho, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos, e por todo carinho e acolhimento no LaBMed.

Ao professor Ermeton Duarte (UFRN), pelos seus ensinamentos e bons momentos no laboratório, e pelos incentivos que me deu força para não desistir.

À Maria Carolina, minha segunda orientadora e exemplo, por despertar em mim uma grande paixão por Microbiologia e pela nossa profissão. Por todo o aprendizado, carinho, paciência, e confiança depositada em mim.

À professora Beatriz Meurer (UFRJ) por ter colaborado na identificação das amostras de *A. baumannii*.

Ao professor Renato Motta (UFRN), a Isabella (LaBMed) e aos alunos do LABMIC, pelo apoio prestado, pelos ensinamentos, disponibilidade e momentos de descontração.

Ao professor Josélio (UFRN), professor Verissimo (UFRN) e aos alunos do LADIC, pela colaboração e pela permissão para utilizar os equipamentos do vosso laboratório sempre que precisava.

Ao professor Paulo Medeiros (UFRN) pela colaboração com as análises estatísticas.

As alunas de Iniciação Científica do LaBMed Isabelle, Camila e Taíla por todo o auxílio prestado sempre que solicitava, pelas longas horas de trabalho e de momentos descontraídos passadas comigo no laboratório.

Aos amigos e ex-alunos do LaBMed Ganielson, Thiago, Julliete, Bruna Costa, Renata e Talita, pela convivência e o sentimento de família que desenvolvemos entre nós, me auxiliando sempre que precisava.

A minha colega e amiga Émilia (LaBMed), pelo companheirismo, pelos aprendizados, pelo carinho e amizade desde o primeiro dia que pisei no laboratório e pela linda amizade que surgiu entre nós.

As técnicas do Laboratório de Aulas Práticas de Microbiologia, Érika Galvão, Paulianne e ao Lucas por todo o auxílio, e a permissão para realizar os meus procedimentos no laboratório sempre que precisava ao longo do meu mestrado.

Ao professor Humberto Fulco, coordenador do PPgCB, por todo o empenho que faz por este programa e por toda

Aos meus colegas de pós-graduação por essa caminhada que realizamos juntos ao longo desses dois anos.

A Louise da Mata, secretária do PPgCB pela disponibilidade de esclarecer as minhas dúvidas e de por ter resolvido todos os problemas que surgiam.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por ter me aceitado e ter permitido enaltecer mais ainda minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço a CAPES pela concepção da bolsa ao longo desse período.

A todos os meus amigos que fizeram parte da minha formação e que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## RESUMO

A espécie bacteriana *Acinetobacter baumannii* se destaca não somente como um dos principais patógenos envolvidos em infecções relacionadas a saúde (IRAS) em pacientes hospitalizados, particularmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), mas também pela grande capacidade de aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Recentemente, a redução da susceptibilidade aos biocidas como antissépticos e desinfetantes vem sendo relatado em muitas espécies, incluindo em *A. baumannii*. Assim, objetivo dessa pesquisa foi determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos e aos biocidas clorexidina e cloreto de benzalcônio de cepas de *A. baumannii* provenientes de amostras clínicas de hospitais gerais da cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. As amostras foram coletadas entre Março de 2013 a Março de 2014. Foram identificadas através de provas bioquímicas convencionais e confirmadas pela pesquisa do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> e pelo sistema MALDI-TOF e, estocadas em freezer a -20°C no Laboratório de Bacteriologia Médica da UFRN. Essa pesquisa foi realizada com 135 cepas de *A. baumannii*, as quais foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antibióticos comumente utilizados na prática clínica, pelo método de disco difusão (Kirby-Bauer) e quanto a resistência aos carbapenêmicos pelo teste do sinergismo disco duplo contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). A susceptibilidade aos biocidas foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima, utilizando o método de microdiluição em caldo, segundo recomendações do CLSI. Além disso, foi aplicada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de genes que codificam as carbapenemases IMP-1, VIM-1, NDM-1, OXA-23, -24, -58, -143 e as bombas de efluxo QacE, AdeB e AdeJ. Foi observado um perfil de multirresistência (MDR) aos antibióticos em 70,37% (95/135) dos isolados e 44,21% (42/95) destes, foram extensivamente resistentes (XDR) ao apresentarem resistência a todos os antibióticos, com exceção à tigeciclina, cuja resistência foi observada em apenas um isolado. A resistência aos carbapenêmicos foi observada em 71,85% (97/135). Setenta e sete isolados foram positivos para a produção de metalobetalactamases (MBLs) no qual apenas as enzimas NDM-1 e IMP-1 foram detectadas em 15,85% e 2,06% desses isolados, respectivamente. Os genes *bla*<sub>OXA-23</sub> e *bla*<sub>OXA-143</sub> foram os mais prevalentes, representando 90% e 28% dos isolados, respectivamente. Quanto a avaliação da susceptibilidade aos biocidas, 19,25% (26/135) dos isolados apresentaram susceptibilidade reduzida a clorexidina e 40% (54/135) ao cloreto de benzalcônio. A presença dos genes para as bombas de efluxo AdeB e AdeJ foram positivas na maioria dos isolados correspondendo a 115 (85,19%) e 129 (95,85%), respectivamente, mas estatisticamente não mostraram associação significativa com a tolerância aos biocidas testados ( $p < 0,05$ ). Enquanto que a presença do gene *qacE* mostrou relação significativa ( $p = 0,0006$ ) com a susceptibilidade reduzido a clorexidina, estando presente em 46,15% (12/26) dos isolados tolerantes a esse composto. Outra associação significativa foi observada entre a susceptibilidade reduzida ao cloreto de benzalcônio com o perfil de multirresistência dos isolados. As cepas de *A. baumannii* com um perfil de alta resistência compromete enormemente o tratamento de infecções por esse micro-organismo, assim como limita de forma importante os agentes utilizados no processo de higienização e desinfecção hospitalar. Deve haver, portanto, uma vigilância permanente quanto a transmissão cruzada em ambientes hospitalares e buscar o uso de biocidas mais eficazes.

Palavras-chaves: *Acinetobacter baumannii*; Multirresistência; Biocidas; *qacE* ; *bla*<sub>OXA-23</sub>.

## ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* species stands the main pathogens involved in hospital-acquired infection (HAI) in hospitalized patients, particularly in Intensive Care Units (ICUs), and has a great capacity to acquire antimicrobial resistance mechanisms. Recently, the reduction of susceptibility to biocides as antiseptics and disinfectants has been reported in many species, including *A. baumannii*. The aim of the present study was to determine the susceptibility profile to antibiotics and to the biocides chlorhexidine and benzalkonium chloride susceptibility profile of clinical isolates of *A. baumannii* from general hospitals in the city of Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. The samples were collected among March 2013 to March 2014, identified through conventional biochemical tests, confirmed by the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene and MALDI-TOF system, and stored in a freezer at -20 ° C in the Laboratório de Bacteriologia Médica (LaBMed), UFRN. The susceptibility of 135 samples of *A. baumannii* to antibiotics commonly used in clinical practice was evaluated by the disc diffusion method (Kirby-Bauer) and by EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) combined disk test. The susceptibility to biocides was evaluated by determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by using the broth microdilution method, according to CLSI recommendations. In addition, the Polymerase Chain Reaction (PCR) assay was used for the detection of genes encoding the carbapenemases IMP-1, VIM-1, NDM-1, and OXA-23, 24, 58, 143 and the efflux pumps QacE, AdeB and AdeJ. The multidrug resistance (MDR) profile was observed in 70,37% (95/135) of the isolates and 44,21% (42/95) were extensively resistant (XDR) since they were resistant to all antibiotics, except for Tigecycline, whose resistance was observed in only one isolate. Resistance to carbapenems was detected in 71,85% (97/135) of the isolates. Seventy seven isolates were positive for metallo-beta-lactamases (MBLs) and just the NDM-1 and IMP-1 enzymes were detected in 15,85% and 2,06% on these isolates, respectively. The *bla*<sub>OXA-23</sub> (90%) and *bla*<sub>OXA-143</sub> (28%) genes were the most prevalent. Regarding the biocides susceptibility assessment, 19,25% (26/135) isolates presented reduced sensitivity to chlorhexidine and 40% (54/135) to benzalkonium chloride. The *adeB* and *adeJ* genes were detected in almost all isolates corresponding to 115 (85.19%) and 129 (95.85%), respectively, although this results did not show a positive association with tolerance to the biocides tested, statistically ( $p < 0,05$ ). However, *qacE* gene showed a significant relationship ( $p = 0,0006$ ) with the susceptibility reduced to chlorhexidine, being present in 46,15% (12/26) of the isolates less susceptible to this compound. Another significant association was observed between the reductions of susceptibility to benzalkonium chloride and the multiresistance profile of the isolates. This research describes strains of *A. baumannii* with a resistance profile that greatly compromises the treatment of infections by this microorganism, as well as limits the agents used in the hospital sanitization and disinfection process. There should therefore be permanent surveillance of cross-transmission in hospital settings and seek the use of more effective biocides.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Multiresistance; Biocides; *qacE*; *bla*<sub>OXA-23</sub>.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1--Diagrama representativo da ação da clorexidina na membrana da célula bacteriana.....	32
Figura 2- Mecanismos de resistência aos biocidas em bactérias.....	34
Figura 3- Representação das cinco famílias de sistemas de bombas de efluxo de multidrogas envolvidos na resistência aos antibióticos e tolerância aos biocidas Clorexidina (CHX), Compostos Quaternários de Amônio (QAC) e Triclosan (TRI).....	36
Figura 4- CIM para os biocidas clorexidina e cloreto e benzalcônio. ....	42
Figura 5- Distribuição dos isolados resistentes aos antibióticos testados. GEN: gentamicina; AMI: amicacina; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime; PIT: piperaciclina+tazobactam; SUT: sulfametoxazol+trimetropim; IMP: imipenem; MEN: meropenem; TGC: tigeciclina; TET: tetraciclina. ....	47
Figura 6-- Teste de sinergismo de disco com EDTA para a produção de metalobetalactamases. ....	47
Figura 7-Distribuição dos isolados de acordo com os valores da CIM para clorexidina e cloreto de benzalcônio.....	48
Figura 8- Eletroforese em gel de agarose com visualização das bandas correspondentes aos produtos da PCR para o gene adeJ. M: Marcador de Peso molecular; 1: controle positivo para gene adeJ (cepa HM 25); 2, 3, 5-9, 11-18: amostras positivas para o gene; 19: controle negativo. ....	49
Figura 9-Eletroforese em gel de agarose com visualização das bandas correspondentes aos produtos da PCR para o gene adeB (cepa HM 25); 2-11: amostras positivas para o gene adeB; 12: controle negativo. ....	50
Figura 10- Eletroforese em gel de agarose com visualização das bandas correspondentes aos produtos da PCR para o gene qacE. M: Marcador de Peso molecular; 1: controle positivo para	

gene qacE (cepa HM 25); 2, 3,5-9,11-18: amostras positivas para o gene; 19: controle negativo.  
..... 50

Figura 11- Perfil de susceptibilidade a Clorexidina (A) e ao Cloreto de Benzalcônio (B) de isolados resistentes aos antibióticos testados. TS: Tipo Selvagem; NS: Não-Susceptível; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime; PIT: piperaciclina+tazobactam; SUT: sulfametoxazol+trimetropim; APS:ampicilina+sulbactam; IMP: imipenem; MEN: meropenem; TGC: tigeciclina; TET: tetraciclina ..... 53

Figura 12- Quadro de dados dos isolados clínicos estudados e os resultados da pesquisa realizada.....84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers utilizados para pesquisa de genes de resistência e para bombas de efluxo.....	43
Tabela 2 - Associação entre a presença dos genes qacE, adeB e adeJ e o perfil de susceptibilidade à clorexidina e ao cloreto de benzalcônio.....	51
Tabela 3 - Associação entre a presença de multirresistência aos antibióticos e o perfil de susceptibilidade à clorexidina e ao cloreto de benzalcônio.....	52
Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade aos antibióticos e aos biocidas dos isolados de acordo com o sitio de isolamento. ....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ABC** – *ATP-binding cassette*
- **ACB** – *Complexo Calceticus-Baumannii*
- **AMC**- Agar MaConkey
- **AMI** - Amicacina
- **AmpC** – Ampicilinase C
- **AN**- Agar Nutriente
- **ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- **AS**- Agar Sangue
- **ATCC** – *American Type Culture Collection*
- **BGNF**- Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores
- **CAZ** - Ceftazidima
- **CBZ**- Cloreto de Benzalcônio
- **CFX** - Cefotaxima
- **CHDLs**- Carbapenemases hidrolizantes de  $\beta$ -lactamases da classe D
- **CIP** - Ciprofloxacina
- **CLSI** – *Clinical and Laboratory Standard Institute*
- **CLX** - Clorexidina
- **CMH** – Caldo Muller-Hinton
- **CIM** – Concentração inibitória mínima
- **CPM**- Cefepime
- **CRO** - Ceftriaxona
- **DNA**- Ácido Desoxirribonucleico
- **ECOFF**- *Epidemiological Cut -OFF*
- **EDTA**- Ácido Etilenodiaminotetracético
- **EMA** – Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
- **ESBL** - Betalactamases de espectro estendido
- **EUCAST** – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Society*
- **FDA**- *Food and Drug Administration*
- **IMP** - Imipenem

- **IMP**- Imipenemase
- **IRAS**- Infecções relacionadas a assistência à saúde.
- **LaBMed** – Laboratório de Bacteriologia Médica
- **LPS**- Lipopolisacarídeo
- **MALDI TOF MS** - *Matrix-assisted laser desorption/ionizationTime of Flight Mass Spectrometry*
- **MATE** - *Multidrug and Toxic Compound Extrution*
- **MBL** – Metalobetalactamases
- **MDR**- *Multidrug resistance*/Resistente a múltiplas Drogas/Multirresistência
- **MFS** – *Major Facilator Superfamaly*
- **MRSA** – *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus*
- **NDM** – *New Dehli Metallo-betalactamase*
- **NS** – Não susceptíveis
- **OMS** – Organização Mundial de Saúde
- **OMVs**- Vesículas de membrana externa
- **PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- **PIT** – Piperaciclina + Tazobactam
- **QAC** – Compostos quaternários de Amônio
- **RNA**- Ácido Ribonucléico
- **RND** –*Resistance- Nodulation- Division*
- **SMR** – *Smal Multidrug resistance*
- **SPM**- São Paulo Metallo-betalactamase
- **SUT** – Sulfametoxazol + Trimetropim
- **T2SS**- Sistema de Secreção de Proteínas 2
- **TBE** – Tris + Borato + EDTA
- **TE** – Tris + EDTA pH 8
- **TET**- Tetraciclina
- **TGC** - Tigeciclina
- **TS**- Tipo Selvagem
- **TSA**- Agar Triptona de Soja
- **TSI** - *Triple Sugar Iron*

- **UFC**- Unidade Formadora de Colônias
- **UFRN**- Universidade Federal do Rio Grande do Norte
- **UFRJ** – Universidade Federal Do Rio de Janeiro
- **UTI**- Unidade de Terapia Intensiva
- **VIM**- Verona Imipenemases
- **XDR**- *Extensive drug resistance* / extensivamente resistente

## LISTA DE SÍMBOLOS

- % - porcentagem
- °C - graus Celsius
- dl- decilitro
- mg- miligrama
- min- minuto
- ml -mililitro
- N –Número de Isolados
- nm -nanômetro
- ph – potencial Hidrogeniônico
- rpm- Rotações por minuto
- β- Beta
- µg- micrograma
- µm –micromilímetros
- V- volts
- v/v – porcentagem em volume

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	21
	2.1. A ESPÉCIE <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	21
	2.2. PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	21
	2.3. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	22
	2.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	25
	2.4.1. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos.....	26
	2.4.1.1. Resistência aos Carbapenêmicos.....	27
	2.4.1.1.1. Metalobetalactamases .....	27
	2.4.1.1.2. Carbapenemases da classe D hidrolizantes de $\beta$ -lactâmicos .....	28
	2.4.1.2. Outras betalactamases: ESBL e AmpC.....	29
	2.4.2. Resistência a outros antibióticos .....	29
	2.5. BIOCIDAS: CLOREXIDINA E CLORETO DE BENZALCÔNIO .....	31
	2.5.1. Tolerância ou Redução de susceptibilidade aos biocidas.....	33
	2.5.2. Bombas de efluxo multidrogas envolvidos na tolerância aos biocidas .....	35
3.	OBJETIVOS .....	38
	3.1. OBJETIVO GERAL.....	38
	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38



4.	<b>METODOLOGIA.....</b>	39
4.1.	TIPO DE ESTUDO.....	39
4.2.	ASPECTOS ÉTICOS.....	39
4.3.	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....	39
4.4.	AMOSTRA.....	40
4.5.	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS.....	40
4.5.1.	Método de disco-difusão (Kirby-Bauer) .....	40
4.5.2.	Triagem fenotípica da produção de metalobetalactamases (MBLs) ..	40
4.6.	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA SUSCEPTIBILIDADE AOS BIOCIDAS.....	41
4.6.1.	Método de microdiluição em caldo.....	41
4.7.	DETECÇÃO DA PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA .....	42
4.7.1.	Reação em cadeia da polimerase .....	42
4.7.2.	Extração do DNA.....	42
4.7.3.	Amplificação do DNA.....	43
4.7.4.	Eletroforese em gel de Agarose.....	44
4.8.	DETERMINAÇÃO DAS TERMINOLOGIAS E VALORES DE PONTOS DE CORTES	44
4.9.	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	45
5.	<b>RESULTADOS.....</b>	46
5.1.	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	46

5.2.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	46
5.3.	TESTES FENÓTIPOS PARA AVALIAR A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS ...	46
5.4.	DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE CARBAPENEMASES (IMP-1, VIM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143) NOS ISOLADOS BACTERIANOS .....	48
5.5.	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A CLOREXIDINA E AO CLORETO DE BENZALCÔNIO	48
5.6.	PRESENÇA DOS GENES PARA BOMBAS DE EFLUXO QACE, ADEB E ADEJ ..	49
5.7.	TESTES DE ASSOCIAÇÃO.....	50
5.8.	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS E OS BIOCIDAS E O SÍTIO DE ISOLAMENTO	53
6.	DISCUSSÃO .....	56
7.	CONCLUSÕES.....	66
8.	REFERÊNCIAS.....	67
9.	APÊNDICE.....	82
9.1.	APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA APROVAÇÃO DO ESTUDO	82
9.2.	APENCICE B - DADOS DOS ISOLADOS ESTUDADOS .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

A emergência de cepas bacterianas multirresistentes é um fenômeno alarmante que representa um problema de saúde pública mundialmente. A espécie *Acinetobacter baumannii* é descrita como um dos patógenos mais intrigantes na medicina moderna pela sua grande capacidade de aquisição de resistência aos antimicrobianos (LEE et al., 2017). Esse fato lhe conferiu o topo de uma lista publicada pela Organização Mundial da Saúde com relação às espécies bacterianas consideradas “críticas”, as quais necessitam de novos estudos para o desenvolvimento de novas antibióticos (OMS; WHO, 2017).

A espécie *A. baumannii* é a de maior importância dentro do gênero, pela sua alta prevalência em infecções humanas e a sua elevada resistência aos principais antibióticos de escolha para o tratamento das doenças infecciosas bacterianas. De caráter oportunista, essa bactéria é responsável pela etiologia de uma grande variedade de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS) graves nos seres humanos, principalmente em pacientes hospitalizados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI; CORNELIS, 2008; DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Nos hospitais brasileiros, o gênero *Acinetobacter* se encontra entre os patógenos mais notificados, acometendo pacientes hospitalizados em UTI's, com uma frequência de isolamento de 12,6% (ANVISA, 2016). Entre as regiões geográficas do Brasil, o Nordeste apresenta a segunda maior frequência de isolamento *Acinetobacter* spp. nesses pacientes, correspondendo a 13%, ficando atrás somente da região sudeste com cerca de 15% de frequência de isolamento (ANVISA, 2016).

O tratamento de infecções por *A. baumannii* vem sendo gradualmente reduzido a um número limitado de antimicrobianos, devido a sua habilidade de adquirir inúmeros mecanismos de resistência. Nos últimos 20 anos, o panorama mundial da espécie *A. baumannii* é caracterizado pelo aumento de cepas multirresistentes em todas as regiões do mundo, com importantes reduções nas taxas de susceptibilidade a inúmeros agentes antimicrobianos (GALES et al., 2018). O que suscita maior preocupação é a resistência aos beta-lactâmicos, em particular aos carbapenêmicos, uma vez que infecções por cepas de *A. baumannii* com esse perfil de resistência, direciona a terapia para antimicrobianos potencialmente tóxicos ao hospedeiro humano, como as polimixinas e tigecilinas.

Entretanto, outras medidas vem sendo adotadas no controle e prevenção da disseminação de cepas multirresistentes no ambiente hospitalar como, por exemplo, o uso

intenso de biocidas em procedimentos de antissepsia e desinfecção hospitalar (BABAEI et al., 2015). Estes compostos químicos, classificados como antissépticos e desinfetantes, são rotineiramente manipulados, em diferentes concentrações e formulações, principalmente por profissionais da saúde nas instituições hospitalares (ANVISA, 2015). Ao contrário do que ocorre com os antibióticos, existem poucos estudos científicos que investigam a evolução adaptativa de cepas bacterianas em ambientes tratados com biocidas, sobretudo por apresentarem um histórico de boa efetividade sobre esses microrganismos. Os estudos disponíveis sugerem o possível desenvolvimento de tolerância a alguns representantes desses compostos, como o antisséptico clorexidina e o desinfetante cloreto de benzalcônio, em várias espécies bacterianas, inclusive em *A. baumannii* (FERNA; VILA; MARTI, 2015; JEUNE; GALL-DAVID; BONNAURE-MALLET, 2018; LIN et al., 2017; LIU et al., 2017; PRAG et al., 2014; WU et al., 2015).

Baseado na relevância clínica e epidemiológica da espécie *A. baumannii* como agente etiológico de IRAS nos hospitais brasileiros, este estudo visa contribuir com informações sobre a resistência de cepas clínicas dessa espécie bacteriana, isoladas em hospitais da cidade do Natal, aos antibióticos mais utilizados na rotina hospitalar e, especialmente aos biocidas, clorexidina e cloreto de benzalcônio, avaliando o comportamento fenotípico e os respectivos determinantes genéticos associados a resistência a esses compostos.

## 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1. A ESPÉCIE *Acinetobacter baumannii*

O *Acinetobacter baumannii* é a espécie mais relevante do gênero associado a infecções oportunistas em humanos (LIN et al., 2014). A designação da espécie *A. baumannii*, assim como de outras espécies do gênero *Acinetobacter* de relevância clínica, tais como a *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. calcoaceticus* e *A. lwoffii*, foi proposta em 1986 com o avanço no desenvolvimento de métodos moleculares (BOUVET; GRIMONT, 1986). Contudo, devido a diferenças genômicas mínimas entre as espécies *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* e as *genoespécies 3 e 13TU* fez com que estes fossem agrupados e denominados de complexo *A. calcoaceticus – baumannii* (ACB) ou complexo *A. baumannii* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

Morfologicamente, o complexo *A. baumannii* pertence a um grupo heterogêneo de cocobacilos com 0.9-1.6 µm de diâmetro, Gram-negativos e são fenotipicamente não fermentadores de carboidratos, estritamente aeróbios, imóveis, oxidase negativa e catalase positiva (MONTEFOUR, 2008). São microrganismos ubiquitários, amplamente distribuídos no ambiente, sendo já detectados em solo, água, fezes, urina, plantas, animais e humanos (ALMASAUDI, 2016; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Também são caracterizadas como bactérias não fastidiosas e de crescimento rápido em meios utilizados na rotina laboratorial como o ágar Nutriente (AN), ágar triptona de soja (TSA) e ágar sangue (AS; ALMASAUDI, 2016; TOWNER, 1996).

Macroscopicamente, as colônias de *Acinetobacter* spp. são razoavelmente grandes com 1-2 mm de diâmetro, mucóides e brancas (tipo creme) em meios sólidos. Em ágar McConkey (AMC), as colônias aparentam uma coloração rosa clara devido à ausência de fermentação da lactose. A temperatura de incubação ideal para a maioria das cepas de *Acinetobacter* spp. varia de 33-35°C (DOUGHARI, 2011). Distintamente das outras espécies, o *A. baumannii* possui a capacidade de crescimento a 42°C, o que auxilia na sua identificação fenotipicamente (ANVISA, 2013).

### 2.2. PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA

Para se multiplicar e sobreviver, o *A. baumannii* sintetiza compostos essenciais para evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Recentemente, a realização de análises

genômicas e fenotípicas permitiu caracterizar um conjunto de fatores de virulência predominantes em *A. baumannii*, responsáveis pela sua patogenicidade no hospedeiro. Estes incluem: (i) porinas tipo OmpA, associada a invasão, aderência e apoptose em células epiteliais humanas (CHOI et al., 2005); (ii) o lipopolissacarídeo (LPS) e a cápsula de polissacarídeo, que contribuem para resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilme (GEISINGER; ISBERG, 2015; LEE et al., 2017); (iii) fatores enzimáticos como as fosfolipases C e D, capazes de desestabilizar a membrana da célula hospedeira, interferindo na sinalização celular e alterando o sistema imunológico do hospedeiro (CAMARENA et al., 2010; JACOBS et al., 2010; LEE et al., 2017); (iv) vesículas de membrana externa (OMVs) contendo LPS, OmpA, RNA, DNA e outros compostos nocivos que geram citotoxicidade na célula hospedeira (JIN et al., 2011); (v) o *Acinetobactin*, um sideróforo pertencente ao sistema de aquisição de metais capaz de gerar destruição de células epiteliais (GADDY et al., 2012); (vi) e outros, como o sistema de secreção de proteínas tipo 2 (T2SS), o *CipA*, um ligante de plasminogênio que compõem o conjunto de mecanismos de patogenicidade em *A. baumannii* (LEE et al., 2017). Contudo, esses mecanismos necessitam de investigações adicionais para uma melhor elucidação sobre o estabelecimento e progressão das infecções por essa espécie (DOUGHARI, 2011; LEE et al., 2017).

### 2.3. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR *Acinetobacter baumannii*

A espécie *A. baumannii* é classificada como um patógeno oportunista comumente associado a surtos hospitalares devido a sua alta incidência em pacientes com quadros clínicos graves em UTIs. Grande parte das infecções por *A. baumannii* envolvem sistemas de órgãos que contêm altos níveis de fluidos, como o sistema respiratório, circulatório, urinário e a cavidade peritoneal (ALMASAUDI, 2016). Deste modo, as principais IRAS atribuídas ao *A. baumannii* incluem pneumonia nosocomial associada à ventilação mecânica, infecções da pele e tecidos moles, infecções de feridas, infecções do trato urinário, meningite secundária, e infecções da corrente sanguínea (ALMASAUDI, 2016; DOUGHARI, 2011; LEE et al., 2017; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

As infecções da corrente sanguínea e do trato respiratório são as mais relatadas e geralmente, mais associadas as altas taxas de morbidade e mortalidade causadas por *A. baumannii* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). A ocorrência de infecções da corrente

sanguínea por *A. baumannii* é mais comumente relacionada ao uso de catéteres respiratórios e intravasculares, que permite o acesso da bactéria ao sangue (ALMASAUDI, 2016). A taxa global de mortalidade por infecções da corrente sanguínea por *A. baumannii* varia de 34 a 43.4% nas UTIs, enquanto a mortalidade por infecções do trato respiratório varia dos 30 a 75% (ALMASAUDI, 2016; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). No Brasil, o gênero *Acinetobacter* destaca-se como o quarto patógeno mais frequentemente notificado no país como agente etiológico de infecções primárias da corrente sanguínea associada ao uso de cateter venoso, em pacientes adultos hospitalizados em UTIs, com uma frequência de isolamento de 12,6%. O Sudeste e o Nordeste são as regiões geográficas do país que apresentam uma maior frequência de isolamento de *Acinetobacter* spp. acometendo pacientes hospitalizados em UTIs, correspondendo a 15% e 13%, respectivamente. (ANVISA, 2016). Em pacientes neurocirurgiados, o *A. baumannii* é responsável por 4% das meningites, com uma taxa de 70% de mortalidade. Além disso, esta espécie é responsável também por 2,1% de infecções de feridas adquiridas nas UTIs (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018) .

Com a implementação de métodos de tipagem molecular, foi possível investigar melhor a disseminação do *A. baumannii* em vários países, identificando cepas epidêmicas em diferentes hospitais, provavelmente transmitidas entre pacientes colonizados (DOUGHARI, 2011). Surto de infecções por *A. baumannii* são ocasionais, porém súbitos, por geralmente serem inesperados e de difícil controle (FRIEDMAN; BENDINELLI, 2008). Entre os anos de 1977 e 2010, foram relatados 162 surtos hospitalares notificados em todo mundo, sendo 107 referentes a espécie *A. baumannii*, segundo o banco de dados de surtos hospitalares<sup>1</sup>.

O estabelecimento e a gravidade de uma infecção por *A. baumannii* depende de vários fatores, porém o sítio de infecção e a vulnerabilidade imunológica individual são os mais determinantes (LEE et al., 2017; VIEIRA; PICOLI, 2015). Tais infecções são na sua maioria ocasionadas por procedimentos invasivos, como cirurgias e aplicação de dispositivos invasivos. O uso de tubos endotraqueais intravasculares, ventriculares e cateteres urinários contaminados, propicia o aumento da colonização oportunista por esse microrganismo (DOUGHARI, 2011). A colonização por *A. baumannii* muitas vezes permanece despercebida ou

---

<sup>1</sup> Site <https://www.outbreakdatabase.com/QueryResults/QueryPage.aspx>- acessado em Outubro de 2018).

não detectada no paciente hospitalizado, possibilitando a sua disseminação no ambiente (FRIEDMAN; BENDINELLI, 2008).

A habilidade do *A. baumannii* de sobreviver sob condições secas por longos períodos à temperatura ambiente em superfícies abióticas, permite a sua colonização e persistência em equipamentos médicos, como tubos de ventilação, dispositivos de monitoramento, entre outros (ALMASAUDI, 2016). Cepas de *A. baumannii* podem ser transmitidas através da proximidade efetiva de pacientes e profissionais da saúde ou por objetos pertencentes ao ambiente hospitalar como, grades das camas, maçanetas das portas, mesas, lavatórios, mictórios de plástico, bancadas, entre outros. Desta forma, as circunstâncias locais da unidade clínica tal como a má higienização e a umidade do ambiente são também fatores determinantes para a ocorrência de infecção e o risco de surto por essa espécie (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

Todavia, os principais fatores predisponentes para a aquisição de infecções por *A. baumannii* incluem: o grau de competência imune do paciente associado a uma doença subjacente, queimaduras, a faixa etária, longa permanência no hospital, em particular nas UTIs (DOUGHARI, 2011). Outro fator importante é o uso indiscriminado de antibióticos, que propicia um aumento da pressão seletiva de cepas resistentes (SANTOS, 2004). Isso explica o surgimento de cepas de *A. baumannii* resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos prescritos rotineiramente, incluindo aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluoroquinolonas, e os beta-lactâmicos, em particular os carbapenêmicos (SOHAIL et al., 2016).

Com a introdução de novos antibióticos na prática clínica, o uso extensivo de dispositivos invasivos nas UTIs e o aumento de relatos de infecções hospitalares adquiridas por *A. baumannii* resistentes a múltiplas drogas (MDRs) e extensivamente resistentes a drogas (XDRs), esta espécie surge como um patógeno emergente de importância mundial (DOUGHARI, 2011). Em um estudo epidemiológico realizado pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (2016) demonstrou que nos últimos 20 anos o complexo ACB tem mostrado uma importante perda de susceptibilidade a inúmeros agentes antimicrobianos em todas as regiões geográficas do mundo. A América Latina possui a segunda maior frequência de isolamento (61,5%) de *A. baumannii* XDRs, posicionando-se atrás da região Europeia cuja frequência corresponde a 66,4 % (GALES et al., 2018). No Brasil, a frequência de isolamento



de *Acinetobacter* spp. nas UTIs com perfil de resistência aos carbapenêmicos atinge 85%, segundo dados recentes disponibilizados pela ANVISA (2016).

#### 2.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana tem se tornado um problema global de grande escala. Devido ao crescente número de cepas bacterianas resistentes, estima-se que até 2050, 10 milhões de pessoas morrerão acometidas por infecções por bactérias resistentes (O'NEILL, 2014). O *A. baumannii* é um dos patógenos mais desafiadores quando se refere a resistência aos antibióticos, desde a década de 70, quando surgiram os primeiros isolados resistentes, inicialmente às penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cloranfenicol e tetraciclina. O aumento da pressão seletiva, principalmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos, explica o surgimento de cepas *A. baumannii* resistentes aos principais agentes antimicrobianos utilizados na terapia de doenças infecciosas como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (SOHAIL et al., 2016).

A emergência de cepas de *A. baumannii* MDRs têm sido muito relatada mas, a maior preocupação, atualmente, são as cepas XDRs, caracterizadas pela aquisição de resistência aos carbapenêmicos, permanecendo sensíveis apenas às drogas polimixinas e tigeciclina (XIE et al., 2018). Esse perfil de resistência limita as opções de antimicrobianos para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDRs, posicionando esse microrganismo no primeiro lugar da lista de “patógenos prioritários” que necessitam de pesquisa e do desenvolvimento de novos antibióticos, publicada pela OMS, representando uma grave ameaça à saúde pública global (WHO, 2017).

As opções de antibióticos efetivos para o tratamento de infecções por cepas com esse perfil tem sido a colistina e a tigeciclina, os quais geralmente são associados a uma variedade de efeitos adversos (XIE et al., 2018). Contudo, existem relatos de cepas de *A. baumannii* resistentes também as essas drogas em países como Israel (NAVON-VENEZIA; LEAVITT; CARMELI, 2007), Irã (KARMOSTAJ; PEERAYEH; SALMANIAN, 2013) e Portugal (CANEIRAS et al., 2018).

A resistência aos antibióticos em *A. baumannii* pode ser conferida por inúmeros mecanismos, intrínsecos ou adquiridos, nos quais podem ser a superprodução de bombas de efluxo, redução da permeabilidade da membrana externa, alteração do sítio alvo e produção

de betalactamases, sendo este último, o principal mecanismo de resistência nesse gênero (LEE et al., 2017).

#### 2.4.1. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos correspondem ao maior grupo de antimicrobianos utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas. O mecanismo de ação desta classe de antibióticos é determinado pela sua interferência em enzimas responsáveis pela formação da camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana. Os representantes dessa família possuem um anel  $\beta$ -lactâmico em comum no seu núcleo estrutural e são classificados de acordo com a sua estrutura química das cadeias laterais, em: cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e os carbapenêmicos, sendo este último, o  $\beta$ -lactâmico de maior espectro de ação antibacteriana (ANVISA, 2007).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode ser conferida por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Os não enzimáticos podem ser alterações nas proteínas de membrana externa, expressão de bombas de efluxo e alterações na afinidade de proteínas ligantes da penicilina (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Um desses mecanismos bem conhecido em *A. baumannii* é o sistema de bombas de efluxo de multidrogas AdeABC da família RND (*Resistance-Nodulation-Division*) por apresentar uma afinidade a inúmeros substratos, incluindo os  $\beta$ -lactâmicos (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001; NOWAK; SEIFERT; HIGGINS, 2015; WONG et al., 2009). Em outros estudos foi demonstrado que a perda de proteínas de membrana, como a porina *CarO* conferem a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* (ECHENIQUE et al., 1992; MUSSI et al., 2007; QUALE et al., 2003). Contudo a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *A. baumannii* é conferida principalmente pelo mecanismo de degradação enzimática atribuída as betalactamases.

A ação das betalactamases é o mecanismo mais estudado e descrito em *A. baumannii* por ser o mais prevalente, além dos genes codificantes dessas enzimas serem facilmente disseminadas entre bactérias de espécies diferentes por meio de elementos genéticos móveis (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). A ação dessas enzimas se estabelece pela quebra do anel  $\beta$ -lactâmico da estrutura molecular dos fármacos dessa classe, resultando na síntese do ácido sem efetividade sobre a célula bacteriana (ANVISA, 2007).

#### 2.4.1.3. Resistência aos Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem ou Doripenem) vêm sendo uma das mais importantes opções terapêuticas para infecções graves causadas por *A. baumannii* (FISHBAIN; PELEG, 2010). A resistência a essa classe de antimicrobianos pode ser conferida por combinações de diferentes mecanismos, contudo esse comportamento fenotípico em *A. baumannii* é mais associado a produção de carbapenemases, conhecidas por hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos.

As carbapenemases mais prevalentes nessa espécie são as metalobetalactamases (MBLs) da classe molecular B de Ambler e as serino-carbapenemases da classe D hidrolizantes de  $\beta$ -lactâmicos (CHDLs) ou também conhecidas como Oxacilinases (EL-MAHDY et al., 2017). Tais enzimas, na sua maioria são codificadas por grupos de genes plasmidiais amplamente descritos em *Acinetobacter* e também em espécies das Enterobacteriaceae (BENJAMIN A. EVANS, 2014; BOGAERT et al., 2013; CHEN et al., 2011; ROZALES et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

##### 2.4.1.3.1. Metalobetalactamases

As MBLs adquiridas possuem a capacidade de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos (Aztreonam), fazendo o uso de um metal, geralmente o Zinco, como cofator para realizar a sua função enzimática. Atualmente, as MBLs mais prevalentes em vários países do mundo são a IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), NDM (New Deli Metallo) e a enzima SPM (São Paulo Metallobetalactamases), sendo essa mais restrita ao Brasil, porém não é prevalente em *A. baumannii* (ANDRADE; DARINI, 2017).

Entre essas enzimas, a NDM se tornou a mais relevante MBLs devido ao aumento da sua detecção em enterobactérias e bacilos Gram negativos não fermentadores (BGNF) ao redor do mundo, causando infecções hospitalares graves e de difícil tratamento (ANDRADE; DARINI, 2017). No Brasil, já foram relatados casos de *Acinetobacter* spp. produtores da variante NDM-1 no Rio Grande do Sul (PAGANO et al., 2015), Santa Catarina (CHAGAS et al., 2014) e no Paraná (PILLONETTO et al., 2014). As cepas isoladas nestes estudos eram portadoras do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> que codifica a variante NDM-1. O gene *bla*<sub>NDM-1</sub> é considerado um dos genes com grande potencial de disseminação por estar associado a elementos genéticos

móveis como plasmídeos, contribuindo assim para o aumento da aquisição de resistência aos carbapenêmicos (PAGANO *et al.*, 2015).

#### 2.4.1.3.2. Carbapenemases da classe D hidrolizantes de $\beta$ -lactâmicos

As CHDLs são as enzimas mais predominantes na espécie *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (BENJAMIN A. EVANS, 2014). Essa classe de enzimas apresenta um potencial de hidrólise bastante amplo, agindo geralmente sobre as penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Pertencentes ao grupo serino-carbapenemases, estão amplamente distribuídas em vários países do mundo, sendo mais prevalente na Europa (ANDRADE; DARINI, 2017). Atualmente, existem cinco subclasses de CHDLs associadas ao *A. baumannii*: a enzima intrínseca OXA-51 e as enzimas adquiridas OXA-23, OXA-143, OXA-58 e OXA-24/40 (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018). O gene *bla*<sub>OXA-51</sub> é utilizado como ferramenta de identificação da do *A. baumannii* por ser intrínseco a essa espécie (BENJAMIN A. EVANS, 2014).

A enzima OXA-23 foi a primeira a ser descrita em *A. baumannii* na Escócia em 1985, mesmo ano em que foi aprovado o uso do Imipenem (BENJAMIN A. EVANS, 2014). Além dos carbapenêmicos, o OXA-23 tem a habilidade de hidrolisar também as piperacilinas, aminopenicilinas e o aztreonam. A disseminação de cepas de *A. baumannii* portadores do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> tem sido amplamente relatado em várias regiões do mundo (EL-MAHDY *et al.*, 2017; JOSHI *et al.*, 2017; LISBOA *et al.*, 2012; PFEIFER *et al.*, 2016; ZENATI *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2007). Na América Latina, o OXA-23 predomina em todos os países dessa região, tratando-se da carbapenemase mais frequentemente detectada em *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018).

Seguido do OXA-23, o OXA-143 é o segundo grupo de carbapenemases mais detectado em *A. baumannii* no Brasil (TEREZA *et al.*, 2015). Desde 2004 até os dias de hoje, o gene *bla*<sub>OXA-143</sub> foi detectado apenas no Brasil, sendo mais prevalente no sul do país (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018). As enzimas do grupo OXA-58, semelhante às outras, possuem fraca atividade contra os carbapenêmicos e penicilinas e nenhuma atividade contra a ceftazidima, cefotaxima e cefepime (BENJAMIN A. EVANS, 2014). No Brasil, a detecção do gene *bla*<sub>OXA-58</sub> é relativamente baixa, comparada com outros países da América Latina como a Bolívia e o Chile (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018).

Além do OXA-58, a OXA-24/40 também é uma das CHDLs menos comumente identificado em *Acinetobacter* spp. Contudo, recentemente a variante OXA-72 pertencente a esse subgrupo, tem sido identificada em *A. baumannii*, por meio de sequenciamento genético (CHEN et al., 2018; LIRA et al., 2013; PICA; CARDOSO; GALES, 2011; QUEZADA et al., 2016). A descrição mais recente foi relatada no Brasil em 2013, em que um estudo demonstrou a emergência de *A. baumannii* XDR produtores de OXA-72 com a possibilidade de disseminação de clones de resistência pelo país (LIRA et al., 2013).

#### 2.4.1.4. Outras betalactamases: ESBL e AmpC

Das betalactamases descritas, a AmpC (Ampicilinase C) pertence à classe C do grupo 1 da classificação das betalactamases de Bush (1995) e confere resistência às cefamicinas e às cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (BUSH; JACOBY, 2010). Essas enzimas são codificadas por genes cromossômicos *ampCs* e na sua maioria são produzidas pelos bacilos Gram negativos. Em *A. baumannii*, esse fenótipo de resistência é determinado pela expressão constitutiva do gene intrínseco *bla<sub>ABC</sub>* e sabe-se atualmente que a sua hiperexpressão está associada a presença do elemento genético *IS<sub>Aba1</sub>* no genoma da bactéria (HAMIDIAN; HALL, 2013; KARAH et al., 2017).

Outro representante das betalactamases clinicamente importantes são as betalactamases de espectro estendido (ESBL). São enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e aos monobactâmicos, porém são coibidos por inibidores de betalactamases (LITAKE et al., 2015). Inúmeras ESBLs já foram descritas e estão amplamente distribuídas ao redor do mundo. Cepas de *A. baumannii* produtores de ESBLs são relativamente raras e na sua maioria produzem enzimas pertencentes a família TEM, SHV e CTX-M (GHAIMA, 2018; LITAKE et al., 2015; OWLIA et al., 2012; MOHAJERI et al., 2011).

#### 2.4.2. Resistência a outros antibióticos

A amicacina e a tobramicina, pertencentes a classe dos aminoglicosídeos, são dois agentes que aparentemente mantêm efetividade contra cepas de *A. baumannii* (FISHBAIN; PELEG, 2010). Contudo, assim como tem sido visto em relação aos outros antimicrobianos, a espécie *A. baumannii* tem-se mostrado resistente aos aminoglicosídeos. Akers et. al. (2010) demonstraram em seu estudo que a diminuição da efetividade da amicacina sobre *A.*

*baumannii* MDRs deve-se a presença de genes codificadores de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs). A maioria das enzimas descritas, incluído acetiltransferases, nucleotidotransferases e fosfotransferases medeiam a resistência a gentamicina, tobramicina e amikacina em *A. baumannii* (AKERS et al., 2010). Além das EMAs, a resistência aos aminoglicosídeos, nesta espécie, também pode ser conferida pelo sistema de bombas de efluxo AdeABC da família RND (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001).

Similar aos aminoglicosídeos, muitos antibióticos da classe quinolonas são também substratos alvos para as bombas de efluxo de multidrogas, incluindo as bombas AdeABC e a AdeM (SU et al., 2005; VILA et al., 1997). Mas as modificações na DNA girase ou na topoisomerase IV devido a mutações nos genes *gyrA* e *parC* são as mais descritas em *A. baumannii* (HAMOUDA; AMYES, 2004; VILA et al., 1997).

A tetraciclina pertence ao grupo de antibióticos bacteriostáticos cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica, bloqueando o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante o processo (MALEKI et al., 2014). A minociclina e a doxiciclina são as representantes dessa classe disponíveis por infusão intravenosa para o tratamento de infecções por *Acinetobacter* aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*; FISHBAIN; PELEG, 2010). A resistência às Tetraciclinas e seus derivados é mediada principalmente por meio de bombas de efluxo ou pela proteção ribossomal (AKERS et al., 2009). Ribeiro et al. (2003) descreveram a presença dos determinantes *tet(A)* e *tet(B)* que conferem resistência à tetraciclina em isolados clínicos de *A. baumannii* (RIBERA et al., 2003). Além disso, o mecanismo de proteção ribossomal mediado pelos determinantes *tet(M)* e *tet(O)*, também foi descrito em *A. baumannii* (RIBERA; RUIZ; VILA, 2003).

A tigeciclina (TGC) por sua vez, foi o primeiro representante das glicilciclinas utilizadas na prática clínica (LIN et al., 2014). O mecanismo de ação da TGC se baseia na inibição da síntese proteica, bloqueando a incorporação da transferência do RNA no sítio de ligação na subunidade ribossomal 30S. Até então, o uso da TGC constitui um tratamento efetivo contra infecções por *A. baumannii* MDR, juntamente com as polimixinas (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008). A resistência à TGC em *A. baumannii* é associada ao sistema de bombas de efluxo de multidrogas, particularmente as bombas de efluxo AdeABC (LIN et al., 2014). Além desse, outro mecanismo em *A. baumannii* foi descrito em estudo realizado por Deng et al. (2014) em que demonstraram o envolvimento da proteína TetX na

resistência a TGC. A TetX é uma proteína modificadora de sítio alvo, que anteriormente conferia resistência a tetraciclina mas que também usa a TCG como substrato (VOLKERS et al., 2011).

## 2.5. BIOCIDAS: CLOREXIDINA E CLORETO DE BENZALCÔNIO

Os biocidas (desinfetantes, antissépticos e conservantes) são compostos essenciais quando se refere à prevenção e ao controle das IRAS no ambiente hospitalar. Os biocidas começaram a ser usados há 150 anos atrás e, atuam na inibição ou destruição de microrganismos como bactérias, vírus, fungos e príons (RUSSELL, 2003a; WHITE; MCDERMOTT, 2001). Os mecanismos de ação dos biocidas são variados, de amplo espectro que incluem a lise e coagulação de componentes intracelulares, perturbação da homeostasia celular, ação sobre as membranas e a parede celular, inibição de enzimas, do transporte de elétrons, e da fosforilação oxidativa, interação com macromoléculas entre outros (MCONNELL; RUSSELL, 1999).

A eficácia desses compostos depende da concentração e sinergismo entre os componentes de diferentes formulações e têm sido cada vez mais incorporados em diversos produtos como desinfetantes de superfícies, sabonetes, cosméticos, cremes dentais, enxaguantes bucais, entre outros (RUSSELL; MCDONNELL, 2000; WHITE; MCDERMOTT, 2001). Um vasto grupo de biocidas são utilizados extensivamente em hospitais e em outros ambientes de cuidados à saúde, principalmente na desinfecção de vários dispositivos médicos utilizados em pacientes e em superfícies hospitalares, além do processo de antisepsia de pacientes e de profissionais da saúde. Entre eles, estão dispostos os compostos catiônicos: as Biguanidas e os Compostos Quaternários de Amônio (QAC), em particular a clorexidina (CLX) e o cloreto de benzalcônio (CBZ; FAKAN et al., 2000).

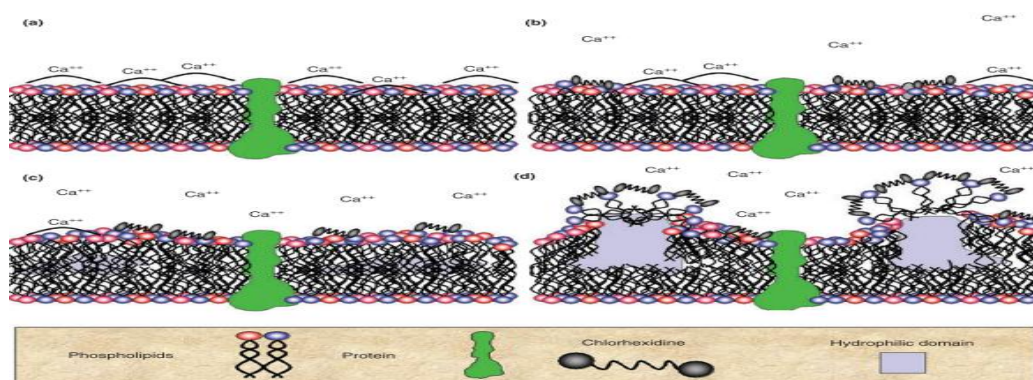
A clorexidina ou digluconato de clorexidina que pertence à classe das biguanidas é utilizada desde 1954 em vários países, como solução tópica antisséptica. Esta biguanida é comercialmente disponível em uma variedade de concentrações (0.12 a 4%) e em diferentes formulações, com ou sem álcool isopropílico ou etílico (WEINSTEIN et al., 2008). No Brasil, a ANVISA (2018) preconiza o uso da solução aquosa ou alcoólica de CLX a 2%, para o preparo da pele do paciente, para a prevenção principalmente de infecções de corrente sanguínea associadas ao uso de cateter venoso, além de ser utilizada em banhos dos pacientes no

processo de descolonização. A CLX também é bastante adicionada em produtos de higiene oral atuando no combate a biofilmes bacterianos e prevenindo doenças periodontais. No entanto, o seu uso na cavidade oral é limitada por apresentarem alguns efeitos adversos (GILBERT; MOORE, 2005; HOPE; WILSON, 2004)

O efeito antimicrobiano da CLX baseia-se na sua ligação forte em sítios aniônicos da membrana e da parede celular, particularmente nos fosfolípidios e nas proteínas (figura 1). Uma vez ligada, a CLX causa um desbalanceamento de cátions ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) promovendo a redução da fluidez da membrana, afetando a regulação osmótica e a capacidade metabólica da membrana e enzimas associadas e consequentemente o extravasamento do conteúdo citosólico (GILBERT; MOORE, 2005; WHITE; MCDERMOTT, 2001).

O cloreto de benzalcônio possui amplo espectro de atividade antimicrobiana e é um dos compostos quaternários de amônio (QAC) mais utilizados no processo de desinfecção hospitalares. O mecanismo de ação é similar a CLX, cuja ligação aos sítios aniônicos da superfície de membrana causam uma desorganização na bicamada lipídica, ilustrado na figura 1 (CAY; OCAMPO-SOSA; FLEMING, 2010; ORTEGA MORENTE et al., 2013). A diferença entre esses dois compostos se encontra nas regiões hidrofóbicas, que se tornam solúveis apenas nos QACs (GILBERT; MOORE, 2005). Este composto, é utilizado como desinfetante de superfícies hospitalares, artigos críticos e semicríticos, sobretudo nas UTIs (EBSERH, 2017; VIGIL; SA; HOSPITALAR, 2017). A ANVISA recomenda o seu uso associado a outros detergentes e, a sua retirada da superfície deve ser completa através do enxague com água em abundância. A concentração aplicada depende das formulações dos fabricantes (VIGIL; SANIT, 2012).

Figura 1--Diagrama representativo da ação da clorexidina na membrana da célula bacteriana



Fonte: GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. Journal of



### 2.5.1. Tolerância ou Redução de susceptibilidade aos biocidas

A evolução do processo adaptativo em situações que lhe são nocivas, vem auxiliando as bactérias no escape da ação dos biocidas, permitindo a sua tolerância e sobrevivência a determinadas concentrações desses produtos. Embora exista evidências laboratoriais de resistência a determinados biocidas, não existem critérios oficiais que possam caracterizar uma bactéria como resistente a esses compostos. Portanto, o termo resistência ainda não é muito aplicado, sendo mais utilizado os termos “tolerância” ou “redução da susceptibilidade” (RUSSELL, 2003a).

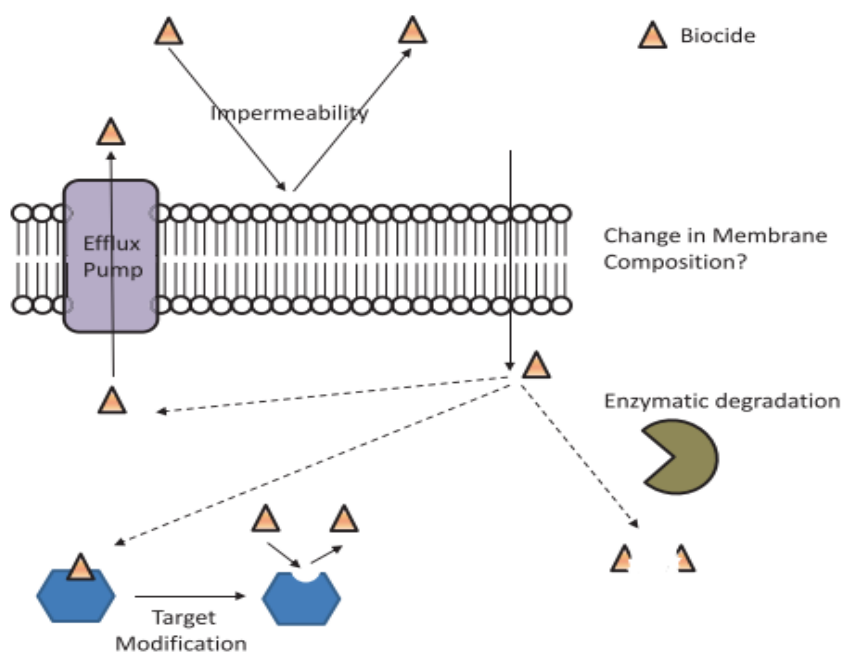
A susceptibilidade reduzida aos biocidas em uma população bacteriana, geralmente é indicativo da presença de uma habilidade adaptativa fenotípica desenvolvida devido a condições de estresse a que foram submetidas (RUSSELL, 1999). Segundo Russel et. al. (2003) os principais fatores que podem contribuir para ocorrência de redução de susceptibilidade aos biocidas são: (i) a presença de concentrações residuais no ambiente e em tecidos vivos; (ii) a utilização de soluções de biocidas com concentrações inadequadas na rotina clínica dos hospitais; (iii) o uso incorreto dos biocidas em superfícies sujas e (iv) o uso de biocidas que não possuam efetividade contra um determinado contaminante por um período de tempo inadequado.

Portanto, mecanismos de resistência intrínsecos vêm sendo associados a redução de susceptibilidade aos biocidas observada em certas cepas bacterianas. Mecanismos esses que podem ser definidos como: (i) a ausência de afinidade do biocida ao alvo bacteriano; (ii) a extrusão do biocida por exportadores ativos intrínsecos; (iii) a inacessibilidade do biocida a célula bacteriana; (iv) e a produção inata de enzimas que inativam o biocida (figura 2). Mecanismos de resistência adquiridos também se encontram descritos na literatura e podem surgir por ocorrência de mutações, ativação da expressão de genes silenciados ou pela aquisição horizontal de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (WAND, 2017).

A perda de susceptibilidade aos biocidas é uma realidade que vem sendo descrita em bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* (COURVALIN; LAMBERT, 1998; RUSSELL, 1997, 2004; VALI et al., 2008; MANIAN et al., 2014;) e em Gram negativas, sobretudo

em BGNF (KAWAMURA-SATO et al., 2008; LEPAINTEUR et al., 2013; MUÑOZ-GALLEGO et al., 2016; PRAG et al., 2014). Em *A. baumannii*, vários autores como o Kawamura-Sato et. al. (2010), Rajamohan et. al., (2010), Fernandez-Cuenca et. al., (2015), Babaei et. al., (2015), Mahzounieh et. al., (2016), Gomaa el. al., (2017), Ebrahimi et. al.,(2017), LIN et al., (2017) e Vijayakumar (2018) apresentaram evidências fenotípicas e genotípicas de redução de susceptibilidade a esses compostos em seus estudos, sobretudo em relação a CLX e ao CBZ.

Figura 2- Mecanismos de resistência aos biocidas em bactérias.



Fonte: WAND, M. E. Bacterial Resistance to Hospital Disinfection. Capítulo 2, Pag. 27, (2017).

Legenda: biocida; impermeabilidade da membrana; mudança da composição da membrana; degradação enzimática; mudança do sitio ativo e ação das bombas de efluxo.

Desde 1973, falhas na efetividade da CLX, vêm sendo descritas, alertando possível emergência de resistência bacteriana aos biocidas. Vários estudos desde então, vem descrevendo a redução de susceptibilidade a CLX (PRAG et al., 2014; THOMAS et al., 2000; VALI et al., 2008; VIJAYAKUMAR et al., 2016a). Inicialmente, essas descrições eram relacionadas a bactérias Gram positivas, sobretudo em *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA; VALI et al., 2008), contudo estudos recentes têm abordado a tolerância a CLX em Gram negativas, em particular em *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter spp.* (ASKOURA

et al., 2011; KUMAR et al., 2016; VIJAYAKUMAR et al., 2016a). A tolerância a CLX é comumente mediada por bombas de efluxo de multidrogas mas outros mecanismos como a inativação do ingrediente ativo e mudanças na estrutura da parede celular também contribuem para tal efeito (KAMPF, 2016).

A tolerância ao CBZ em cepas bacterianas também vem sendo descrita, inclusive em *A. baumannii* (GREGORY A. KNAUF et al., 2018; IVANKOVIĆ; GOIĆ-BARIŠIĆ; HRENOVIĆ, 2017a; KAWAMURA-SATO et al., 2008; LIU et al., 2017). Um dos mecanismos de defesa ao CBZ é a modificação da membrana externa. O LPS age também como barreira protetora na permeabilidade contra este biocida (TANDUKAR et al., 2013). Além destes, outros mecanismos como a ação de bombas de efluxo multidrogas, a produção de biofilme, exercem um impacto na perda da sua efetividade sobre esses microrganismos (GREGORY A. KNAUF et al., 2018).

Estudos sobre o surgimento de possível resistência aos biocidas tem suscitado interesse da comunidade científica e, com isso emerge outra questão importante, o surgimento de co-resistência em relação a alguns antibióticos e biocidas. Com o objetivo de comprovar a ocorrência dessa co-resistência, alguns estudos apresentam evidências de que isolados multirresistentes também são tolerantes aos biocidas ou abrigam genes de resistência ligados a essa tolerância (KAWAMURA-SATO et al., 2010; FERNA; VILA; MARTI, 2015, TANNENBAUM et al., 2016; ARVANEH; MAHZOUNIEH; LOTFALIAN, 2017; IVANKOVIĆ; GOIĆ-BARIŠIĆ; HRENOVIĆ, 2017; PECK et al., 2017; RUSSELL, 2017; SOCIETY; BRITAIN, 2017). Acredita-se que a transferência de genes de resistência aos antibióticos e de elementos genéticos móveis entre bactérias possam contribuir para co-resistência, uma vez que já foi descrito a relação íntima entre os genes *qac* (*qacA/B*) e genes de resistência aos antibióticos (*bla* e *tet*) abrigados em um mesmo plasmídeo em isolados clínicos bacterianos (WAND, 2017).

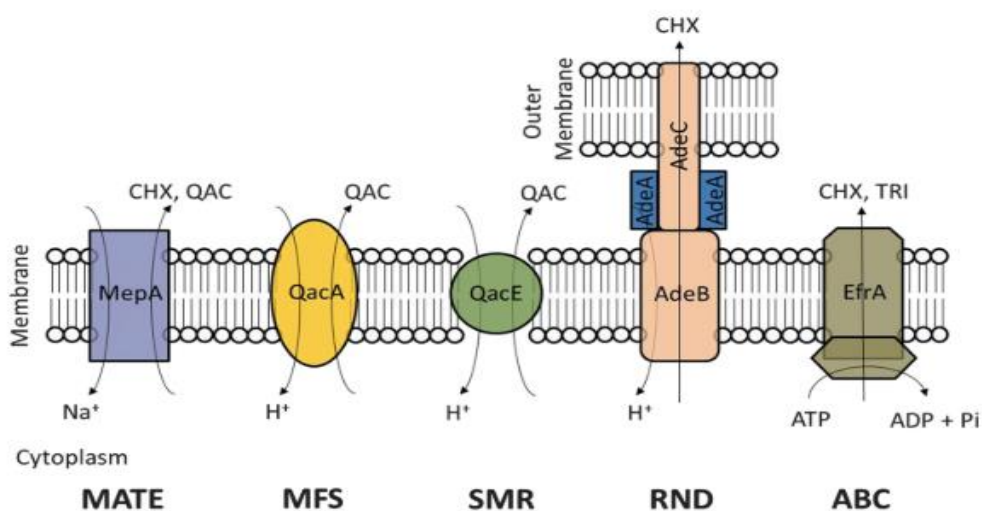
### 2.5.2. Bombas de efluxo multidrogas envolvidos na tolerância aos biocidas

A expressão de bombas de efluxo, responsáveis pela expulsão de antimicrobianos é um mecanismo muito eficiente para a resistência bacteriana. Com isso, cinco superfamílias de sistemas de bombas de efluxo envolvidas na resistência bacteriana a múltiplas drogas, se encontram bem descritas na literatura (figura 3): ABC (*ATP-binding cassette*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug and Toxic Compound extrusion*), MSF (*Major Facilitator Superfamily*) e RND (*Resistance-nodulation –cell division*). As duas mais comumente

associadas a redução de susceptibilidade aos biocidas em *A. baumannii* são as famílias SMR e RND (COURVALIN; PE, 2011).

Em *A. baumannii*, estudos demonstraram que as família RND e SMR estão envolvidas na expulsão de biocidas conferindo a susceptibilidade reduzida a esses agentes (GOVINDAN RAJAMOHAN, 2009; RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010; SRINIVASAN; VENKATARAMAIAH; MONDAL, 2015).

Figura 3- Representação das cinco famílias de sistemas de bombas de efluxo de multidrogas envolvidos na resistência aos antibióticos e tolerância aos biocidas Clorexidina (CHX), Compostos Quaternários de Amônio (QAC) e Triclosan (TRI).



Fonte: WAND, M. E. Bacterial Resistance to Hospital Disinfection. Capítulo 2, Pag. 27 , (2017).

O sistema RND possui ação sobre uma vasta gama de antimicrobianos estruturalmente diferentes, o que explica a sua ação simultânea sobre os biocidas e antibióticos. Pertencentes a este sistema, as bombas de efluxo AdeABC e AdeIJK (*Acinetobacter drug efflux*) constituem um mecanismo de resistência intrínseco ao gênero, atuando no efluxo de antibióticos e biocidas (GOVINDAN RAJAMOHAN, 2009; KRISHNAMOORTHY et al., 2016; LIN et al., 2017).

O sistema AdeABC, foi a primeira a ser descrita e a mais prevalente em *A. baumannii*. Este sistema consiste em uma maquinaria de efluxo constituída por três porções: uma proteína de fusão (AdeA), um transportador de multidrogas (AdeB) e um fator de membrana externa (AdeC) (Figura 2). A expressão da AdeAB é regulada por um sistema regulador AdeR-AdeS (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001; COURVALIN; PE, 2011). O

AdeIJK é a segunda bomba de efluxo mais predominante em *A. baumannii* e é homólogo ao AdeABC, porém não possui um sistema regulatório ainda esclarecido (COURVALIN; PE, 2011). Embora existam evidências que comprovam o envolvimento do sistema AdeIJK na redução de susceptibilidade aos biocidas em *A. baumannii*, os dados existentes são ainda pouco esclarecedores e relativamente escassos (GOVINDAN RAJAMOHAN, 2009; LIN et al., 2017; NOWAK; SEIFERT; HIGGINS, 2015; RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010).

Estudos que demonstram o envolvimento do sistema de efluxo AdeABC e AdeIJK no decréscimo de susceptibilidade a CLX em isolados clínicos de *A. baumannii* associam o fato à presença de genes codificantes desses sistemas, em particular os genes *adeB* e *adeJ*, que são altamente expressas em cepas *A. baumannii* sob condições de estresse por exposição aos biocidas como a CLX e/ou CBZ (GREGORY A. KNAUF et al., 2018; HASSAN et al., 2013; (RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010). Os genes *adeB* e *adeJ* são os mais importantes para a efetividade do sistema de bombas de efluxo, uma vez que já foi verificada em um estudo, que a perda desses genes gera a perda do fenótipo de resistência aos antimicrobianos também, o que reforça a hipótese de que há uma contribuição dessas bombas na redução de susceptibilidade aos biocidas (FRIEDMAN; BENDINELLI, 2008).

As bombas de efluxo da família SMR, por sua vez, são também bem descritas na literatura, particularmente em *S. aureus* (*Smr*, *QacA*, *QacB*, *QacG* e *QacH*) e em Gram-negativos como *P. aeruginosa* com as bombas *QacE*, *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEFOprN* e *MexJK* (RUSSELL, 2004). Entretanto, investigações recentes, feitas por Babaei et. al. (2015) e Liu et. al. (2017) demonstraram por meio de técnicas moleculares, a prevalência dos genes *qacE* e *qacΔE*, conferindo tolerância aos QACs e a CLX em *A. baumannii*. Tais genes codificam as bombas de efluxo *QacE* e *QacEΔ1* bastante expressas em bactérias Gram-negativas, incluindo o *A. baumannii*. O gene *qacE* confere um fenótipo de resistência similar ao gene *smr* do *S. aureus*, e é proveniente de plasmídeos ou de integrons da classe I (KAWAMURA-SATO et al., 2010; GOMAA; HELAL; KHAN, 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Verificar o perfil de susceptibilidade de cepas de *Acinetobacter baumannii* isoladas de hospitais de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, aos antibióticos e biocidas mais utilizados na rotina hospitalar.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de susceptibilidade de cepas de *A. baumannii* aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica, por meio do método de disco difusão (Kirby-Bauer);
- Averiguar a produção de carbapenemases através do teste de sinergismo de disco duplo com EDTA;
- Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antissépticos digluconato de clorexidina e cloreto de benzalcônio pelo método da microdiluição em caldo;
- Investigar genotipicamente a presença dos genes que codificam as oxacilinases; OXA-23, OXA-58, OXA-24, OXA-143, OXA-51, as metallobetalactamases; VIM-1, NDM-1, IMP-1 e dos genes, que codificam proteínas de bombas de efluxo; AdeB, AdeJ e QacE, através da técnica da PCR convencional;
- Verificar a associação entre a susceptibilidade à clorexidina e ao cloreto de benzalcônio com a presença dos genes de bombas de efluxo pesquisados;
- Verificar a associação entre a susceptibilidade reduzida aos biocidas com a prevalência de resistência aos antibióticos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. TIPO DE ESTUDO

Essa pesquisa consiste em um estudo transversal, descritivo e inferencial cujas amostras foram constituídas por espécimes clínicos obtidos de pacientes internados em três hospitais privados (A, B e C) e 1 público (D), localizados na cidade do Natal, Rio Grande do Norte, a partir dos quais foram isoladas bactérias da espécie *Acinetobacter baumannii*.

### 4.2. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Universidade Federal do Rio Grande do Norte sob o protocolo 017/2013 (Apêndice A).

### 4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Foram recebidos 155 isolados de *Acinetobacter* sp. provenientes dos hospitais envolvidos na pesquisa, os quais foram submetidos a testes fenotípicos convencionais para a confirmação da identificação como a coloração de Gram, prova de fermentação de açúcares nos meios TSI (Triple Sugar Iron; HIMEDIA, Índia), prova da citocromo oxidase, da catalase e da motilidade. As amostras com resultados sugestivos para o gênero *Acinetobacter* foram submetidas a prova de crescimento em ágar Mackonkey à 42°C, como é recomendado por Bouvet & Grimont (1987) para a identificação sugestiva da espécie *A. baumannii*. Como controle, foram utilizadas as cepas *P. aeruginosa* ATCC-27853 e *S. aureus* ATCC-25923 em todos os testes de identificação.

Os isolados sugestivos de *A. baumannii* foram submetidos a identificação a nível de espécie, através da técnica de reação em cadeia da polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para a detecção do gene *bla<sub>OXA-51</sub>*, uma vez que esse gene é intrínseco a essa espécie (TURTON et al., 2006a), assim como pelo sistema MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, BD-Bruker Biotyper, Rio de Janeiro). Esse último, foi realizado no laboratório da professora Beatriz Meuer Moreira do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ).

#### 4.4. AMOSTRA

Foram analisados neste estudo 135 isolados bacterianos da espécie *Acinetobacter baumannii* obtidos no período de Março de 2013 a Março de 2014 por demanda espontânea nos hospitais pesquisados. O isolamento primário e a identificação dos isolados como *Acinetobacter* spp. foi realizado pelos microbiologistas dos laboratórios dos hospitais incluídos no estudo. Ao chegar ao Laboratório de Bacteriologia Médica (LaBMed) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), esses isolados foram reisolados em meio de cultivo e tiveram sua identificação confirmada.

#### 4.5. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

##### 4.5.1. Método de disco-difusão (Kirby-Bauer)

O método de disco-difusão foi realizado em todas as amostras, de acordo com as normas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Foram utilizados os seguintes discos de antibióticos (DME, Rio de Janeiro, Brasil): Ciprofloxacina (CIP;5µg), Amicacina (AMI;30µg), Gentamicina (GEN;10µg), Ampicilina + Sulbactam (APS;20 µg), Meropenem (MEN;10µg), Imipenem (IMP;10µg), Sulfametoxazol + Trimetropim (SUT;25µg), Piperacilina + Tazobactam (PIT;110µg), Ceftazidina (CAZ;30µg), Cefepime (CPM;30µg), Tetraciclina (TET;30µg), Ceftriaxona (CRO;30µg) e Cefotaxima (CTX;30µg). A Concentração Mínima Inibitória para o antimicrobiano Tigeciclina (TGC) foi feita através do E-teste® (Oxoid, Inglaterra), de acordo com as recomendações do *Food and Drug Administration* (FDA, 2017). Como controle foram utilizadas as cepas de *P. auroginosa* ATCC-27853 e *E. coli* ATCC-25922.

##### 4.5.2. Triagem fenotípica da produção de metalobetalactamases (MBLs)

Uma amostragem de 100 isolados selecionados aleatoriamente, constituída por cepas que apresentaram resistência a pelo menos um dos carbapenêmico testado (Imipenem ou Meropenem) e cepas sensíveis, foram avaliadas quanto a produção de enzimas MBLs, de acordo com as recomendações do CLSI (2018). A técnica utilizada para esse teste baseia-se na comparação da susceptibilidade da cepa ao disco de carbapenêmico (IMP) sem e com



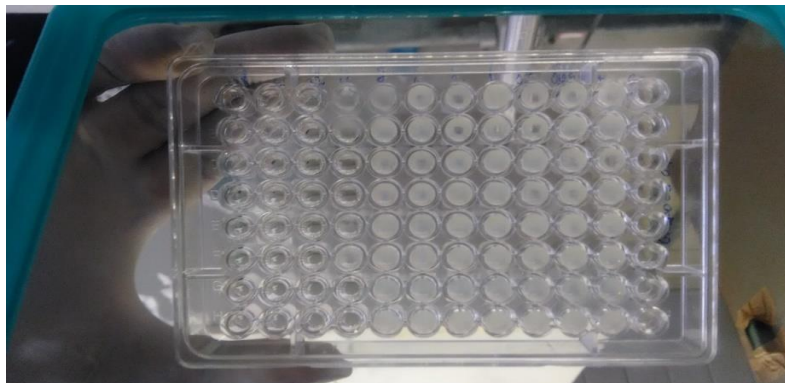
associação com EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético). A quelação do cofator (Zinco) presente na metalobetalactamase, pela ação do EDTA, impede a atividade dessa enzima. O teste é considerado positivo quando a medida do halo de inibição aumenta cerca de 5 mm no tamanho, quando comparado ao halo do disco sem EDTA (Figura 4). Foi utilizada uma cepa de *Acinetobacter* spp. produtora de MBLs como controle positivo.

#### 4.6. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA SUSCEPTIBILIDADE AOS BIOCIDAS

##### 4.6.1. Método de microdiluição em caldo

O método de Microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) dos biocidas clorexidina (CLX) e cloreto de benzalconio (CBZ), baseando nas recomendações do CLSI (2018) e na metodologia descrita por Vijayakumar (2016). A obtenção destes compostos foi feita através de uma farmácia de manipulação, cuja concentração inicial da solução aquosa da clorexidina e do cloreto de benzalconio foi de 20% e 50% (v/v), respectivamente. A partir dessas concentrações foi preparado soluções estoque dos compostos de modo a obter 10 ml da solução total a 4% (v/v). A partir dessa solução foi preparada uma solução estoque com uma concentração final de 5120 µg/ml. Seguiu-se então a realização de diluições seriadas dos biocidas em tubos contendo caldo Müller-Hinton estéril (CMH; HIMEDIA, Índia), de modo a obter as seguintes concentrações: 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml e 64 µg/ml. Posteriormente, 50 ml de cada concentração foi distribuída em placas de 96 poços (KASVI, China) previamente identificadas. O inóculo das cepas bacterianas foi preparado a partir de um crescimento *overnight* no meio de cultivo TSA (HIMEDIA, Índia). Deste crescimento, realizou-se suspensões bacterianas de modo a obter uma turbidez equivalente a escala de 0,5 de McFarland em solução salina estéril (NaCl-0,9%). Em seguida a suspensão foi diluída 1:10 em CMH, obtendo uma concentração de 10<sup>7</sup> UFC/ml. Feito isso, 50µl do inóculo bacteriano foi adicionado nos poços das microplacas contendo as concentrações dos biocidas previamente distribuídas. As placas foram incubadas a 35 ± 1°C por 18-24hrs e a leitura visual foi realizada com um auxílio de um espelho invertido (Figura 4), um método proposto por Vijayakumar (2016). A cepa *Escherichia coli* ATCC-25922 foi utilizada como controle negativo, e como controle positivo, foi utilizada a cepa de *A. baumannii* (HM 25; Apêndice B).

Figura 4- CIM para os biocidas clorexidina e cloreto e benzalcônio.



Fonte: arquivo pessoal.

#### 4.7. DETECÇÃO DA PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA

##### 4.7.1. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada para a pesquisa dos genes que codificam as carbapenemases IMP-1, VIM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 e OXA-51. Além desses genes, foi feita a pesquisa dos genes que codificam as bombas de efluxo QacE, AdeB e AdeJ (Tabela 1).

##### 4.7.2. Extração do DNA

A obtenção do DNA bacteriano a partir dos isolados foi feita através do método de lise térmica de acordo com o protocolo descrito por Carlos et. al. (2016). Em um microtubo de centrifugação foi obtida uma suspensão densa de colônias puras dos isolados crescidos *overnight* em TSA (HIMEDIA, Índia) em 500 µl da solução tampão TE (Tris + EDTA pH 8) e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. Após esse período, o *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 µl da solução TE e incubado em banho-maria a 100°C por 15 min. Posteriormente, as amostras foram congeladas por 10 min no *freezer* a – 20°C e centrifugadas por 5 min a 14.000 rpm. Uma alíquota (100 µl) do sobrenadante, contendo o DNA bacteriano, foi removida para outro microtubo estéril e estocada a -20°C até a sua utilização.



<b><i>bla</i><sub>OXA143</sub></b>	F	5'AGTTAACTTTCAATAATTG 3'		KARINA et al., 2012.
	R	5' TTGGAAAATTATATAATCCC 3'		
<b><i>qacE</i></b>	F	5'ATGAAAGGCTGGCTT 3'	346 pb	MAHZOUNIEH et al., 2014.
	R	5'TCACCATGGCGTCGG 3'		
<b><i>adeB</i></b>	F	5'GAATAAGGCACCGCAACAAT 3'	125 pb	NOWAK; SEIFERT;
	R	5'TTTCGCAATCAGTTGTTCCA 3'		
<b><i>adeI</i></b>	F	5'CTTGGTGTAAGTCCCGGATT 3'	605 pb	HIGGINS, 2015.
	R	5'TGAGCACCAGACTCACGTTC 3'		

- \*pb: pares de bases; F\*: forward; R\*\*\*: reverse.

#### 4.7.4. Eletroforese em gel de Agarose

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de Agarose a 1% e submetidos a eletroforese para a visualização das bandas correspondentes, segundo a metodologia descrita por Nordmann et. al. (2011). Para a preparação do gel de Agarose foi diluída na solução Tampão TBE 10% (v/v; Tris-Borato-EDTA). O mesmo tampão foi utilizado também na corrida da eletroforese a uma corrente de 100 V por 1h. A visualização das bandas no gel previamente corado em Brometo de Etídio, foi realizada sob a luz ultravioleta.

#### 4.8. DETERMINAÇÃO DAS TERMINOLOGIAS E VALORES DE PONTOS DE CORTES

As terminologias aplicadas para a classificação do perfil de susceptibilidade aos biocidas ainda são controversas na literatura. Os termos “resistente” ou “resistência” a um determinado biocida só pode ser aplicado quando o microrganismo não é inativado por concentrações de uso clínico, o que até agora não foi detectado. Pela falta de padronização dessas terminologias, neste estudo foi aplicado os termos “não-suscetível/susceptibilidade reduzida” ou “tolerante/tolerância”, sugeridos por A. Russel (2003) e aplicados em outros estudos (IVANKOVIĆ; GOIĆ-BARIŠIĆ; HRENOVIĆ, 2017b; KAWAMURA-SATO et al., 2008; LIU et al., 2017).

Devido à ausência de critérios interpretativos clinicamente relevantes, a definição de resistência aos biocidas, tal como é estipulado aos antibióticos, precisa ainda ser estabelecida, visto que não existem pontos de cortes padronizados pelas organizações

internacionais como o CLSI e o EUCAST (LAVILLA LERMA et al., 2015). No entanto, Morrissey et. al. (2014) e Lin et al. (2017) propuseram a determinação do valor de corte epidemiológico ou ECOFF (*Epidemiological cut-off value*) em seus estudos. A determinação do ECOFF se baseia na avaliação da distribuição de CIM de uma determinada droga em relação a determinada espécie bacteriana, de modo a separar populações bacterianas e representativas para uma população tipo selvagem e para uma população com resistência.

Portanto, através do programa estatístico freeware “ECOFFinderXL2010” (EDELSTEIN, 2017), o ECOFF foi determinado, para estimar o ponto de corte para os biocidas testados neste estudo de modo a estabelecer duas populações: Tipo Selvagem (TS) e Não Susceptíveis (NS). Os isolados com valores de CMI menor ou igual a 16µg/ml, foram categorizados como tipo selvagem e os isolados cujos valores de CMI foram acima de 32µg/ml, foram classificados como Não susceptíveis.

#### 4.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O teste Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a existência ou não de associação entre a linhagem de susceptibilidade aos biocidas com a presença dos genes de bombas de efluxo e a linhagem de multirresistência aos antibióticos. Foram considerados estatisticamente significativos as associações em que  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Dos 155 isolados, 135 foram sugestivos para a espécie *A. baumannii* pela prova de crescimento a 42°C, os quais foram utilizados nessa pesquisa. Todos os 135 apresentaram o gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, assim como um score compatível para a espécie *A. baumannii* pelo sistema MALDI-TOF MS.

### 5.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Das 135 cepas de *A. baumannii* identificadas, 111(82,22%) foram provenientes de hospitais privados, distribuídas da seguinte forma: 60(44,44%) provenientes do hospital A, 31(23%) do hospital B e 20(14,81%) do hospital C. As demais 24(17,78%) foram oriundas do hospital público.

A maioria das cepas foi isolada a partir de secreções variadas 44(32,60%), seguido de secreção traqueal 38(28,15%), sangue 31(22,96%) e urina 12(8,88%). O restante foi proveniente de sítios como ponta de cateter 5(3,70%), líquido ascítico, pleural e líquido cefálico raquidiano 5(3,70%), fragmento de tecido 4(2,96%) e de *swab* sacral e nasal 2(1,48%)

### 5.3. TESTES FENÓTIPOS PARA AVALIAR A RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Noventa e cinco isolados (70,37%) apresentaram um perfil de multirresistência, ou seja, se mostraram resistentes a três ou mais classe de antibióticos, quando testados com a técnica do disco-difusão. Destes, 42(44,21%) apresentaram resistência a todos os antibióticos testados, apresentando sensibilidade apenas à tigeciclina, sendo classificados como XDR. Dos 135 isolados analisados, 40(29,63%) apresentaram sensibilidade à maioria dos antibióticos testados e 97 (71,85%) mostraram resistência a pelo menos um dos carbapenêmicos testados (Meropenem e Imipenem).

Em relação à tigeciclina (TGC), observou-se uma variação de concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,125 a 8,0 µg/ml. Apenas 1/135(0,074%) dos isolados foi considerado resistente a este antimicrobiano, por apresentar a CIM igual a 8,0 µg/ml. O restante das amostras foi sensível a este antibiótico (Figura 5).

Para a presença de MBLs, um total de 100 isolados (75 resistentes e 25 sensíveis aos carbapenêmicos pela técnica do disco-difusão) foram selecionados para a análise. Destes, 77(77%) foram positivos para a produção dessa enzima, sendo que 58 (77,3%) entre os 75 resistentes aos carbapenêmicos, e 19 (76%) dentre as sensíveis aos carbapenêmicos, foram positivos para o teste (Figura 6).

Figura 5- Distribuição dos isolados resistentes aos antibióticos testados. GEN: gentamicina; AMI: amicacina; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime; PIT: piperaciclina+tazobactam; SUT: sulfametoxazol+trimetopim; IMP: imipenem; MEN: meropenem; TGC: tigeciclina; TET: tetraciclina.

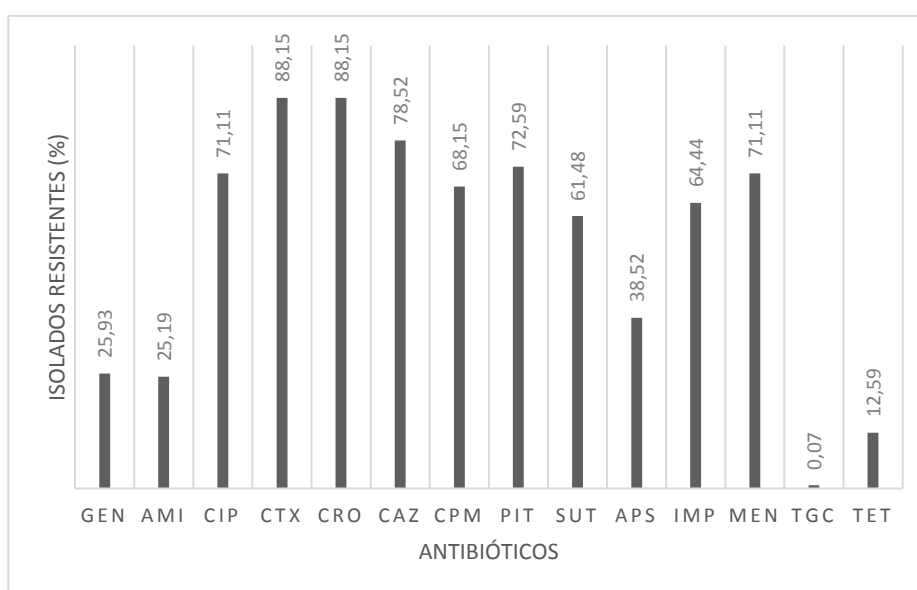


Figura 6-- Teste de sinergismo de disco com EDTA para a produção de metalobetalactamases.



Fonte: arquivo pessoal.

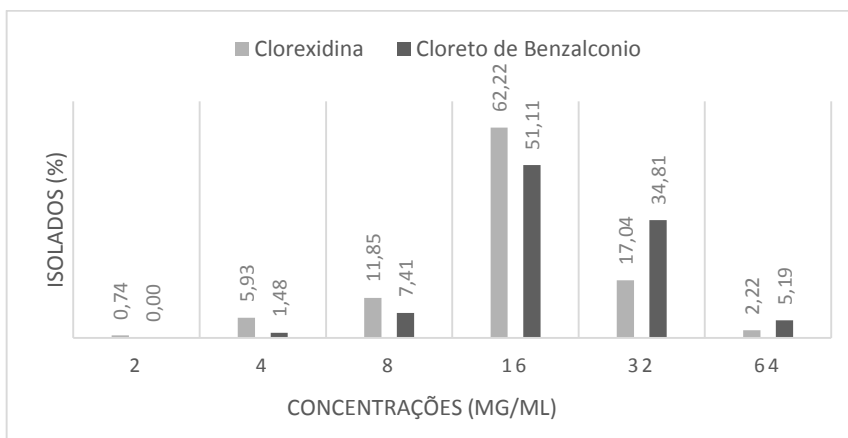
#### 5.4. DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE CARBAPENEMASES (IMP-1, VIM-1, NDM-1, OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, OXA-143) NOS ISOLADOS BACTERIANOS

A pesquisa dos genes que codificam as MBLs IMP-1, VIM-1 e NDM-1 foi realizada nos 77 isolados que se apresentaram positivos para a produção do MBLs no teste de sinergismo de disco usando EDTA. Destes, 2(0,026%) foram positivos para a amplificação do gene *bla*<sub>IMP-1</sub>, 12(15,58%) para o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> e nenhum dos isolados foi positivo para a amplificação do gene *bla*<sub>VIM-1</sub>. Os genes que codificam as Oxacilinasas OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 foram pesquisados nos 100 isolados selecionados. Destes, 90(90,00%) se apresentaram positivos para a amplificação do gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, 1(1,00%) para *bla*<sub>OXA-24</sub>, 1(1,00%) para *bla*<sub>OXA-58</sub> e 28(28,0%) para *bla*<sub>OXA-143</sub>. O gene *bla*<sub>OXA-51</sub> foi pesquisado e detectado em todos os isolados, como descrito no Item (4.1), confirmando a identificação da espécie *A. baumannii*. Dez (10,00%) dos isolados portavam dois genes de resistência simultaneamente, *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub>.

#### 5.5. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A CLOREXIDINA E AO CLORETO DE BENZALCÔNIO

Os valores da CIM para a CLX variaram entre 2 a 64 µg/ml, enquanto que para o CBZ, esses valores variaram entre 4 a 64µg/ml (figura 7). A CMI<sub>90</sub> (concentração capaz de inibir 90% dos isolados) e a CIM<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% dos isolados) correspondeu as concentrações 32µg/ml e 16µg/ml, respectivamente, para ambos os biocidas. Um total de 109 (80,74%) dos isolados foram caracterizados como Tipo Selvagem (TS) e 26(19,26%) como Não Susceptíveis (NS) a CLX. A respeito do CBZ, 81(60,00%) dos isolados foram Tipo Selvagem e 54(40,00%) foram Não Susceptíveis

Figura 7-Distribuição dos isolados de acordo com os valores da CIM para clorexidina e cloreto de benzalcônio.





## 5.6. PRESENÇA DOS GENES PARA BOMBAS DE EFLUXO *qacE*, *adeB* E *adeJ*

A pesquisa dos genes *qacE*, *adeB* e *adeJ* mostrou positividade para a amplificação em 29(21,48%), 115 (85,19%) e 129(95,85%) dos isolados, respectivamente. Dos 26 isolados Não Susceptíveis a CLX, 12(46,15%) e 23(88,46%) se apresentaram positivos para a amplificação os genes *qacE* e *adeB*, respectivamente. Enquanto que o gene *adeJ* foi detectado em todos esses isolados. Entretanto, dos 109 isolados do Tipo Selvagem para CLX, 17(15,60%), 97 (89,00%) e 103(94,50%) foram positivos para a amplificação dos genes *qacE*, *adeB* e *adeJ*, respectivamente. Os resultados das PCRs para esses genes, estão representados nas figuras 8, 9 e 10.

Em relação ao CBZ, a presença dos genes *qacE*, *adeB* e *adeJ* foi detectada em 19(35,19%), 46(85,19%) e 50(92,60%), respectivamente, dos 54 isolados que foram nomeados Não Susceptíveis. Dos 81 isolados nomeados Tipo Selvagem para o CBZ, 10(12,35%) foram positivos para o gene *qacE*, 69(85,19%) para o gene *adeB* e 79(97,53%) para o gene *adeJ*.

Figura 8- Eletroforese em gel de agarose com visualização das bandas correspondentes aos produtos da PCR para o gene *adeJ*. M: Marcador de Peso molecular; 1: controle positivo para gene *adeJ* (cepa HM 25); 2, 3, 5-9, 11-18: amostras positivas para o gene; 19: controle negativo.

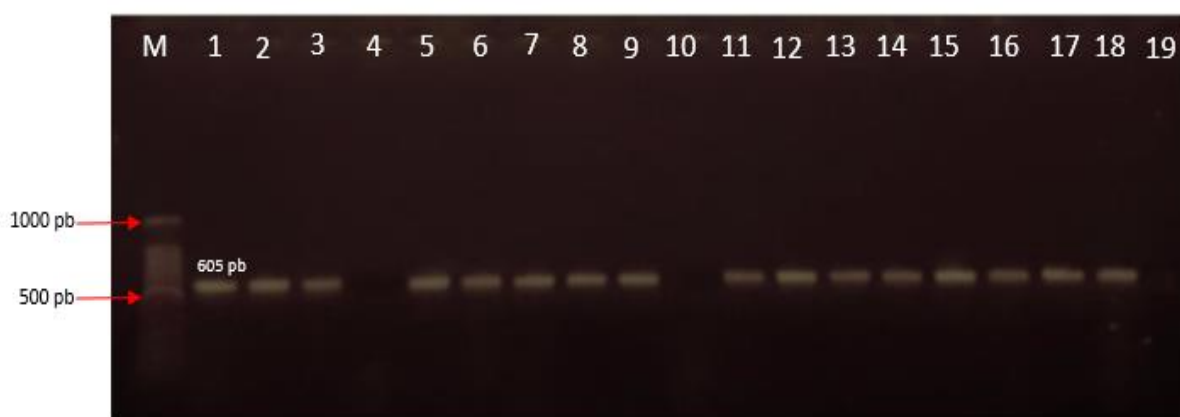


Figura 9-Eletroforese em gel de agarose com visualização das bandas correspondentes aos produtos da PCR para o gene *adeB* (cepa HM 25); 2-11: amostras positivas para o gene *adeB*; 12: controle negativo.

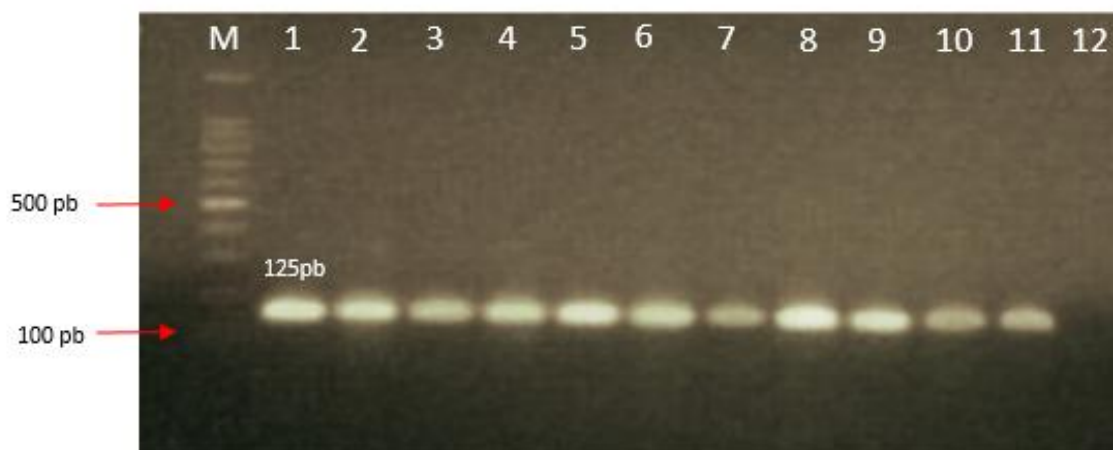
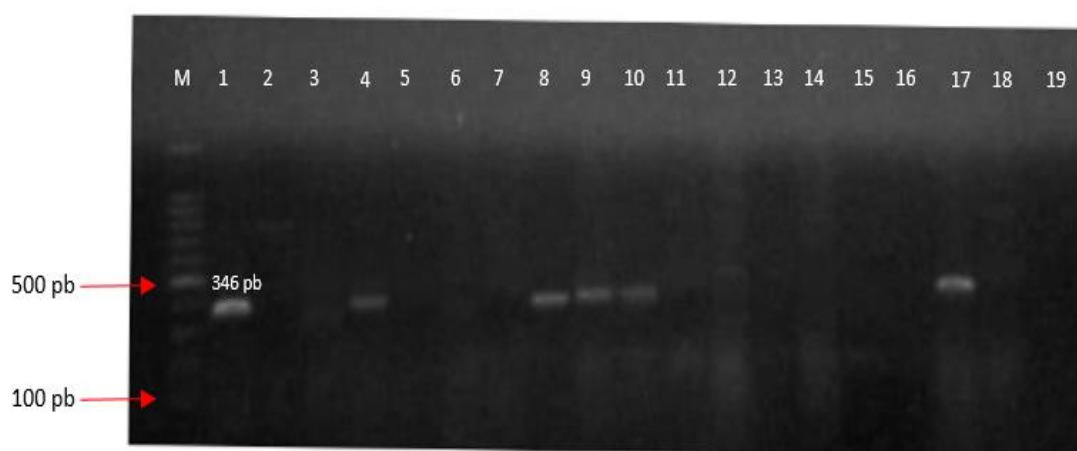


Figura 10- Eletroforese em gel de agarose com visualização das bandas correspondentes aos produtos da PCR para o gene *qacE*. M: Marcador de Peso molecular; 1: controle positivo para gene *qacE* (cepa HM 25); 2, 3,5-9,11-18: amostras positivas para o gene; 19: controle negativo.



### 5.7. TESTES DE ASSOCIAÇÃO

A análise da associação entre a presença dos genes codificadores das bombas de efluxo pesquisadas e o perfil de susceptibilidade aos biocidas testados é apresentada na Tabela 2. Estatisticamente, os dados mostram uma associação significativa entre a presença do gene *qacE* com a susceptibilidade reduzida a CLX ( $p=0,0006$ ) nos isolados deste estudo. Tal associação não foi verificada para os demais genes analisados.

Tabela 2 - Associação entre a presença dos genes *qacE*, *adeB* e *adeJ* e o perfil de susceptibilidade à clorexidina e ao cloreto de benzalcônio.

Genes para bombas de efluxo	Perfil susceptibilidade aos biocidas					
	Clorexidina			Cloreto de benzalcônio		
	TS N (%)	NS N (%)	<i>p</i> -valor	TS N (%)	NS N (%)	<i>p</i> -valor
<b><i>qacE</i></b>	109(100)	26(100)		81(100)	54(100)	
<b>Presença</b>	17(15,60)	12(46,15)	<b>0,0006</b> *	10(12,34)	19(35,18)	0,9490
<b>Ausência</b>	92(84,40)	14(53,84)		62(76,54)	35(64,81)	
<b><i>adeB</i></b>						
<b>Presença</b>	92(84,44)	23(88,46)	0,6007	69(85,18)	46(85,18)	1,0000
<b>Ausência</b>	17(15,59)	3(11,53)		12(14,81)	8(14,81)	
<b><i>adeJ</i></b>						
<b>Presença</b>	103(94,44)	26(100,0)	0,2210	79(97,53)	50(92,59)	0,1726
<b>Ausência</b>	6(5,06)	0(0,00)		2(2,46)	4(7,40)	

N: números de isolados; %: porcentagem de isolados; TS: Tipo Selvagem; NS: Não-Susceptível; \* nível de significância para valores de  $p < 0,05$ .

A análise da associação entre o perfil de resistência aos antibióticos e o perfil de susceptibilidade aos biocidas testados são apresentados na Tabela 3.

Estatisticamente, os dados mostram uma associação significativa entre a multirresistência com o perfil de susceptibilidade a CBZ ( $p=0,0277$ ).

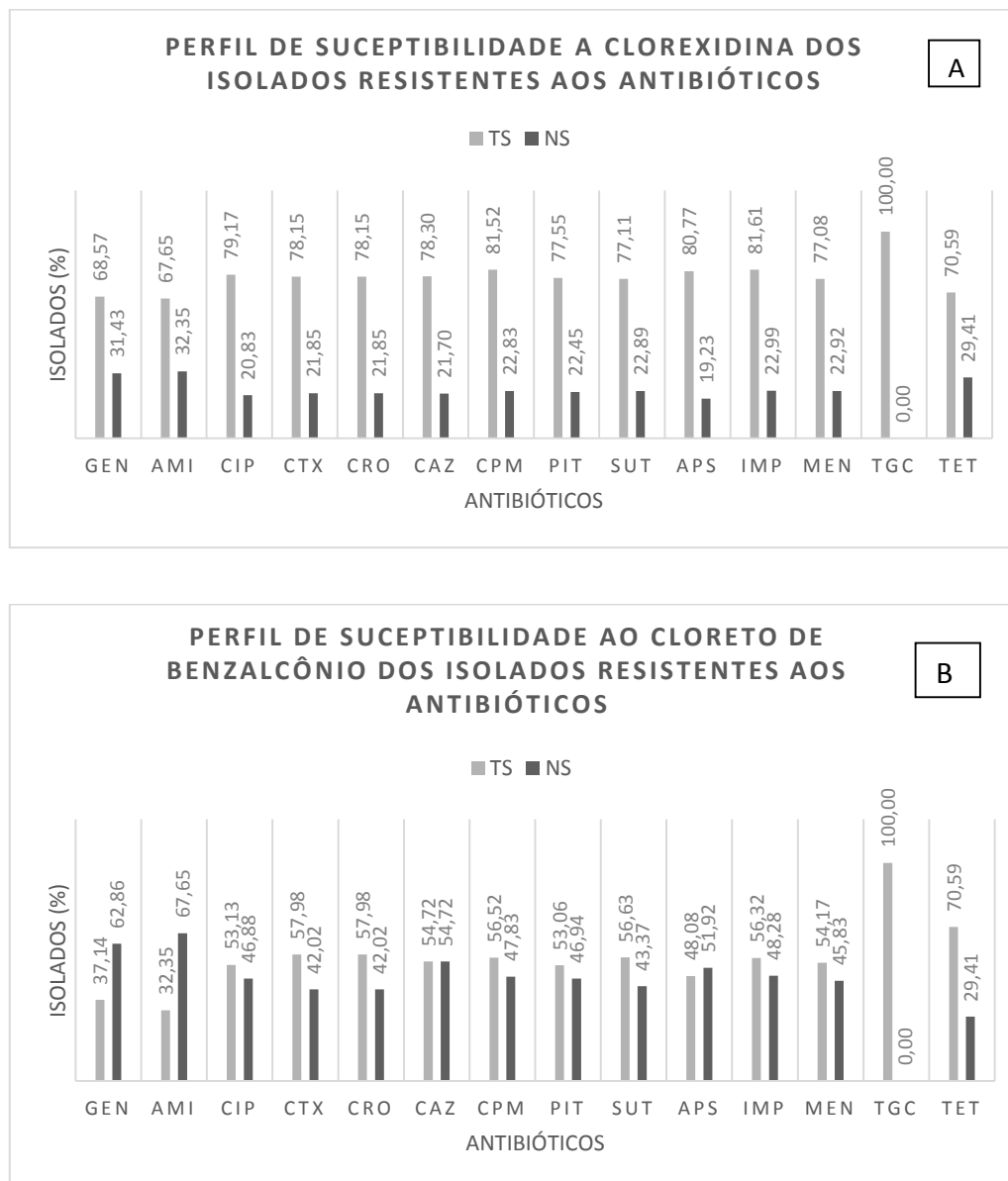
Tabela 3 - Associação entre a presença de multirresistência aos antibióticos e o perfil de susceptibilidade à clorexidina e ao cloreto de benzalcônio.

Perfil susceptibilidade aos biocidas						
Perfil de resistência aos antibióticos	Clorexidina			Cloreto de benzalcônio		
	TS	NS	<i>p-valor</i>	TS	NS	<i>p-valor</i>
	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
	109(100)	26(100)		81(100)	54(100)	
<b>Presença de Multirresistência</b>	75(68,80)	20(76,92)	0,4155	50(61,72)	43(79,62)	<b>0,0277*</b>
<b>Ausência de Multirresistência</b>	34(31,19)	6(23,07)		31(38,27)	11(20,37)	

N: números de isolados; %: porcentagem de isolados; TS: Tipo Selvagem; NS: Não-Susceptível; \* nível de significância para valores de  $p < 0,05$ .

Os isolados resistentes aos antibióticos foram distribuídos de acordo com o seu perfil de susceptibilidade aos biocidas testados (Figura 11 A e B). Na figura 11 A, pode ser observado que mais de 50% dos isolados resistentes para cada antibiótico testado, não apresentaram suscetibilidade reduzida a CLX. Em relação ao cloreto de benzalcônio, os isolados resistentes aos aminoglicosídeos apresentaram susceptibilidade reduzida, uma vez que 62,66% e 67,95% dos isolados resistentes para gentamicina (GEN) e amicacina (AMI) respectivamente, foram Não Susceptíveis a este biocida (figura 11 B). O mesmo pode ser observado em relação a ampicilina+sulbactam (APS) em que 51,92% dos isolados resistentes foram NS.

Figura 11- Perfil de susceptibilidade a Clorexidina (A) e ao Cloreto de Benzalcônio (B) de isolados resistentes aos antibióticos testados. TS: Tipo Selvagem; NS: Não-Susceptível; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime; PIT: piperaciclina+tazobactam; SUT: sulfametoxazol+trimetopim; APS:ampicilina+sulbactam; IMP: imipenem; MEN: meropenem; TGC: tigeciclina; TET: tetraciclina



#### 5.8. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS E OS BIOCIDAS E O SÍTIO DE ISOLAMENTO

Os dados apresentados na tabela 4, permitem visualizar o perfil dos isolados de acordo com o seu sítio de isolamento, onde se pode constatar que a maioria desses sítios abrigava cepas com um perfil de multirresistência aos antibióticos testados. Com relação ao perfil susceptibilidade aos biocidas testados, os dados disponibilizados na tabela mostram que a maioria dos sítios abrigava isolados Tipo Selvagem, com exceção da ponta de cateter em que

5(100%) dos isolados demonstraram ser Não-Susceptíveis para ambos os biocidas, além de serem todos multirresistentes aos antibióticos.

Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade aos antibióticos e aos biocidas dos isolados de acordo com o sítio de isolamento.

Perfil de susceptibilidade dos isolados							
Sítio de isolamento	Total de Isolados N (%)	Antibióticos		BIOCIDAS			
		Presença de multirresistência N (%)	Ausência de multirresistência N (%)	Clorexidina		Cloreto de benzalcônio	
				Tipo selvagem N (%)	Não susceptível N (%)	Tipo selvagem N (%)	Não susceptível N (%)
Secreções variadas	44(32,60)	37(84,10)	8(18,18)	39(88,63)	6(16,22)	22(50,00)	23(52,27)
Secreção Traqueal	38(28,41)	28 (73,68)	10(26,32)	30(78,95)	8(21,05)	23(60,53)	15(39,47)
Sangue	31(22,96)	13 (41,94)	18 (58,06)	26 (83,87)	5 (16,13)	23(74,19)	8 (25,81)
Urina	12(8,88)	10 (83,33)	2 (16,67)	10 (83,33)	2 (16,67)	9(75,00)	3(25,00)
Ponta de cateter	5(3,70)	5 (100,0)	0(0,00)	0(00,00)	5(100,0)	0(00,00)	5(100,00)
Líquido ascítico, pleural e LCR	5(3,70)	3(60,00)	2(40,00)	4(80,00)	1(20,00)	4(80,00)	1(20,00)
Fragmento de tecidos	4(2,96)	4(100,0)	0(0,00)	4(100,0)	0(0,00)	2(50,00)	2(50,00)
Swab sacral e nasal	2(1,48)	2(100,00)	0(0,00)	2(100,0)	0(0,00)	1(50,00)	1(50,00)

Em relação ao tipo de hospital de onde essas amostras foram provenientes e a frequência de cepas com perfil de susceptibilidade reduzida aos biocidas testados, não houve nenhuma diferença considerável. Quanto ao perfil de resistência aos antibióticos, foi observado que a prevalência de cepas MDRs foi maior no hospital público, visto que dos 24 isolados provenientes deste local, 19(79,17%) apresentavam um perfil de multirresistência. Enquanto que os hospitais privados, a prevalência de cepas MDR foi menor correspondendo a 76(68,47) dos isolados.

## 6. DISCUSSÃO

Ao longo do século XX, os antibióticos e os biocidas tornaram-se um alicerce de muitos avanços médicos, principalmente no que se refere a redução de fatalidades causadas por infecções em cirurgias, partos ou até mesmo por pequenos cortes. Contudo, bactérias e outros patógenos vêm se tornando cada vez mais resistentes a essas substâncias e, esta realidade se transformou numa das maiores problemáticas de saúde pública dos últimos anos (O'NEILL, 2014).

Nesse cenário, é bastante importante a compreensão do comportamento fenotípico e dos mecanismos de resistência apresentados por organismos multirresistentes, particularmente em *A. baumannii*, tendo em vista a sua habilidade em adquirir e disseminar genes de resistência, além de ser responsável por índices elevados de mortalidade (10 a 43%) em pacientes hospitalizados nas UTIs (VIEIRA; PICOLI, 2015).

Deste modo, este estudo iniciou-se com a identificação dos isolados bacterianos através de testes fenotípicos convencionas os quais foram satisfatórios, pois os resultados obtidos foram compatíveis com os métodos confirmatórios utilizados, a presença do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> e o MALDI-TOF MS. Porém, outros estudos descrevem que os testes convencionais não são suficientes para a identificação a nível de espécie, sendo necessária a realização de testes moleculares (ABU-QATOUSEH; MATAŁKA, 2014; KULKARNI et al., 2017; PAL; SUJATHA; KUMAR, 2017). O sistema MALDI-TOF MS, que se baseia a técnica da espectrometria de massa, é considerado por muitos autores ser uma técnica eficiente, rápida e precisa na identificação de espécies de *Acinetobacter* clinicamente importantes, principalmente a espécie *A. baumannii* (ÁLVAREZ-BUYLLA; CULEBRAS; PICAZO, 2012; ESPINAL et al., 2011; HSUEH et al., 2014; JEONG et al., 2016). A pesquisa do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> também foi bastante útil para a identificação, uma vez que esse gene é intrínseco ao *A. baumannii*, por se encontrar naturalmente abrigado no genoma desse microrganismo (TURTON et al., 2006a; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006). Embora, estudos demonstrem a presença do gene *bla*<sub>OXA-51</sub> em outras espécies de *Acinetobacter* e em Enterobactérias, sinalizando uma disseminação desse gene por elementos genéticos móveis (LEE et al., 2009, 2012; LESKI; JIMMY, 2013).

Os isolados bacterianos deste estudo, foram provenientes de vários sítios de infecção, sendo a secreção traqueal e o sangue, entre as amostras biológicas mais prevalentes. De fato, dados disponibilizados pelo programa de vigilância antimicrobiana SENTRY (2013),



relatam que o *A. baumannii* é mais frequentemente isolado do trato respiratório inferior (17,7%) e da corrente sanguínea (7,2%), nos países da América Latina (VIEIRA; PICOLI, 2015). Em relação a distribuição dos isolados quanto ao hospital onde as amostras foram coletadas, a frequência foi maior no hospital A, enquanto que nos demais hospitais não houve diferença entre os percentuais encontrados.

Através da técnica de disco difusão, foi possível identificar o perfil fenotípico de resistência das cepas estudadas. A maioria dos isolados apresentou um perfil MDRs, resistentes a mais de três classes de antibióticos testados. Este perfil em *A. baumannii* vem sendo bastante descrito em vários estudos, demonstrando a disseminação de uma linhagem com implicações muito importantes para a saúde pública (ALMASAUDI, 2016; CAI et al., 2012; CAMUS et al., 2016; DENG et al., 2014; FRIEDMAN; BENDINELLI, 2008; HAMMERUM et al., 2015; HARBARTH et al., 2017; MARAGAKIS; PERL, 2008; NARANJO et al., 2013). Um percentual elevado de cepas com perfil XDRs, resistentes a todos os antibióticos testados, exceto à tigeciclina, também foi identificado. O relato de cepas XDRs é considerado de extrema importância, uma vez que limita seriamente as opções terapêuticas (PIANA et al., 2015). Um estudo epidemiológico recente realizado pelo SENTRY (2016), abordando o Panorama Mundial da resistência em *A. baumannii*, demonstrou uma alta frequência de isolamento de cepas de *A. baumannii* XDRs na América Latina (61,5%).

A maioria dos isolados apresentou resistência a quase todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. A resistência às cefalosporinas e aos carbapenêmicos apresentaram um percentual elevado de cepas resistentes neste estudo. A disseminação de infecções por *A. baumannii* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, particularmente as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e aos carbapenêmicos, está associada a sérias implicações clínicas no que diz respeito às opções terapêuticas (GHAIMA, 2018). O percentual de cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos isoladas neste estudo, foi próximo aos dados mais recentes disponibilizados pela ANVISA em 2016, em que esse perfil de resistência foi reportado em 85% dos *Acinetobacter* spp. isolados no Brasil. De acordo com SENTRY (2012), o isolamento de cepas de *A. baumannii* com esse perfil de resistência é muito comum nos países da América Latina, chegando a constituir, representando 60% dos isolados de *Acinetobacter* resistentes aos carbapenêmicos ao redor do mundo. Contudo, dados atuais mostram que houve uma diminuição de 20% desse percentual, porém mesmo assim se mantém elevado quando

comparado com outras regiões do mundo, como a América do Norte e a Europa, cuja frequência de isolamento de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos é de 13% e 15%, respetivamente. Atualmente, apenas 8% a 26% dos isolados de *Acinetobacter*, em todo o mundo, são sensíveis ao imipenem (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

A prevalência de cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos nas instituições de saúde compromete seriamente a aplicabilidade dos  $\beta$ -lactâmicos na rotina clínica, tendo em vista que as cepas que apresentam esse perfil produzem enzimas que degradam praticamente todos os agentes dessa classe de antimicrobiano. Essa particularidade limita as opções de tratamento de infecções por cepas de *A. baumannii* resistentes, além de contribuir para o aumento da mortalidade principalmente de pacientes hospitalizados nas UTIs (HUA et al., 2018). Esse fato foi observado em 1999, no estado do Paraná, onde ocorreu um surto em um hospital, cuja mortalidade registrada foi de 62,5% dos pacientes infectados por *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (DALLA-COSTA et al., 2003). Para o tratamento de infecções geradas por cepas de *A. baumannii* com esse perfil de resistência, outros agentes como colistina, tigeciclina e minociclina tornam-se as únicas opções terapêutica, contudo seu uso deve ser feito de forma cautelosa, pois são antimicrobianos muito antigos e que estão associados a sérios efeitos adversos (LEE et al., 2017).

A tigeciclina é considerado um medicamento efetivo contra cepas de *Acinetobacter* MDRs, embora existam ainda limitações no seu uso na prática clínica em pacientes acometidos por infecções do trato respiratório inferior e da corrente sanguínea (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008). Entre os isolados avaliados neste estudo, apenas um apresentou resistência a tigeciclina (CIM 8,0  $\mu$ g/ml). Até então não havia sido relatado no Brasil a detecção de cepas resistentes a esse agente antimicrobiano, mas estudos em outros países como Israel (NAVON-VENEZIA; LEAVITT; CARMELI, 2007), Irã (KARMOSTAJ; PEERAYEH; SALMANIAN, 2013) e o mais recente em Portugal (CANEIRAS et al., 2018) já relataram a emergência de cepas de *A. baumannii* resistentes a tigeciclina. Atualmente, devido as inúmeras limitações e a toxicidade dessas únicas opções de tratamento, outras perspectivas terapêuticas para tais infecções estão sendo estudadas, como por exemplo o uso combinado de antibióticos como colistina/rifampicina, colistina/sulbactam, colistina /teicoplanina, entre outros (LEE et al., 2017).

O teste de triagem fenotípica para as carbapenemases demonstrou ser pouco útil para a detecção dessas enzimas, uma vez que a maioria das amostras que foram negativas para esse teste eram resistentes aos carbapenêmicos pela técnica do disco-difusão. Além disso, apenas 15% das amostras que foram positivas nessa triagem abrigavam genes codificadores de metalobetalactamases (MBLs). É possível que a diminuição da sensibilidade aos carbapenêmicos *in vitro* possa ser conferida por outras enzimas, como as CHDLs, além de outros mecanismos como a hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo e/ou redução de porinas na membrana externa (ANDRADE; DARINI, 2017). Atualmente, existem testes bioquímicos colorimétricos e testes de inativação de carbapenemases considerados mais específicos para a detecção dessas enzimas (YILDIZ et al., 2017; ZWALUW et al., 2015). Todavia, são testes que exigem um alto custo para sua realização na rotina laboratorial.

A pesquisa das MBLs através da PCR permitiu detectar a presença do *bla*<sub>NDM-1</sub> em 15% dos isolados produtores de MBLs fenotipicamente. Essa ocorrência é alarmante uma vez que, cepas produtoras de NDM-1 é indicativo da presença de plasmídeos transferíveis capazes de serem transmitidos horizontalmente entre as populações bacterianas (KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017). A emergência de cepas de *Acinetobacter* produtoras da variante NDM-1 vem sendo relatada em vários países (CHEN et al., 2011; PASTERAN et al., 2010; ZHANG et al., 2014), inclusive no Brasil (PAGANO et al., 2015; PILLONETTO et al., 2014). Deste modo, estratégias vem sendo estabelecidas nas instituições de saúde ao redor do mundo, de forma a combater a disseminação desse gene, muito associado ao aumento da mortalidade e morbidade de pacientes acometidos por bactérias produtoras dessa enzima. Em 2013, a ANVISA emitiu uma Nota Técnica (01/2013) com medidas específicas para a prevenção e controle de infecções por Enterobactérias produtoras de NDM-1 (ANVISA, 2013b). A detecção precoce dos primeiros casos deve ser assegurada para prevenir futuras ocorrências de infecções de cepas produtoras dessa MBL (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011).

A pesquisa de genes de carbapenemases permitiu observar que as CHDLs foram as mais predominantes nos isolados deste estudo. O gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi detectado em 90% dos isolados pesquisados. Essa característica também foi verificada por outros autores (EL-MAHDY et al., 2017; ZENATI et al., 2016; ZHOU et al., 2007). Este gene é o mais disseminado em cepas de *A. baumannii* isoladas no Brasil, sendo detectado em 94,2% de isolados resistentes aos carbapenêmicos provenientes de cinco regiões geográficas do país, entre 2008 a 2011, em

um estudo realizado por PAVONI et al., 2014. Em um estudo mais recente, o gene *bla*<sub>OXA-23</sub> foi detectado em 87% das amostras de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil (ROCHA et al., 2017).

O gene *bla*<sub>OXA-143</sub> foi o segundo mais frequente neste estudo, correspondendo a 28% dos isolados pesquisados. Resultado idêntico foi observado em um estudo realizado no Brasil por Cordeiro et al. (2016). Desde a sua descoberta em 2004, o OXA-143 vem sendo isolado apenas no Brasil, com uma prevalência de 70% no sul do país (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018). A presença dos genes *bla*<sub>OXA-24/40</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub> c foi detectado em apenas 1% das amostras deste estudo. Outros estudos realizados no Brasil, também encontram uma baixa prevalência desses genes em *A. baumannii*, demonstrando assim que o *bla*<sub>OXA-24/40</sub> e *bla*<sub>OXA-58</sub> são relativamente raros no Brasil (GUSATTI et al., 2012; ROCHA et al., 2017; TEREZA et al., 2015). Todavia, estudos recentes demonstraram em seus resultados a emergência de cepas de *A. baumannii* produtores da enzima OXA-72 pertencente ao subgrupo OXA-24/40, sugerindo uma possível disseminação clonal pelo país (LIRA et al., 2013; PICA; CARDOSO; GALES, 2011; TEREZA et al., 2015). A OXA-58 por sua vez, desde a sua primeira identificação no Brasil, em 2007 por GUSATTI et al. (2012), o isolamento de cepas produtoras dessa enzima tem sido apenas de forma esporádica (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018).

Um fato importante que vale ressaltar neste estudo é a co-existência de diferentes genes para CHDLs em um mesmo isolado. Além do gene *bla*<sub>OXA-51</sub>, que é intrínseco a espécie, foi detectado também a presença dos genes *bla*<sub>OXA-23</sub> e do *bla*<sub>OXA-143</sub> em uma mesma cepa. Essa heterogeneidade genética foi recentemente descrita por Zanganeh e Eftekhari (2015), fato atribuído a transferência horizontal de elementos genéticos como plasmídeos e transposons entre as cepas. Outros elementos genéticos, descritos são as sequências de inserção (IS) que também são determinantes para a disseminação e hiperexpressão de genes de resistência aos carbapenêmicos (TURTON et al., 2006b). A IS descrita como *ISAbal* exerce uma função importante na expressão e transferência de oxacilinas em *A. baumannii*, em particular ao gene *bla*<sub>OXA-23</sub> (CORDEIRO et al., 2016; DENG et al., 2014; ZHOU et al., 2007). A presença do *ISAbal* em *Acinetobacter* pode conferir uma vantagem seletiva para a sua sobrevivência em ambientes que exigem uma maior eficiência na expressão de genes de resistência (SEGAL; GARNY; ELISHA, 2005).

Neste estudo foi possível observar também a presença de genes MBLs e CHDLs em um mesmo isolado, particularmente, os genes *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-23</sub>. Esse fato vem sendo recentemente descrito por vários autores (EL-MAHDY et al., 2017; JOSHI et al., 2017; ZENATI et al., 2016). A coexistência das enzimas NDM-1 e OXA-23 é considerada um aspecto alarmante para história da resistência bacteriana, uma vez que a atividade conjunta dessas duas enzimas contribui amplamente para a sobrevivência e persistência de cepas amplamente resistentes, sobretudo em ambientes hospitalares (ASIF; ALVI; REHMAN, 2018).

Além de avaliar a susceptibilidade aos antibióticos, este estudo também fez uma abordagem sobre a susceptibilidade aos biocidas, particularmente à clorexidina e ao cloreto de benzalcônio. Os valores para CMI<sub>90</sub> a CMI<sub>50</sub> encontrados neste estudo para ambos os compostos testado, foi similar a resultados demonstrados em estudos recentes em *A. baumannii* (LIU et al., 2017; VIJAYAKUMAR et al., 2018; VIJAYAKUMAR; ABOODY, 2016). A determinação da CIM para os biocidas não é considerado adequado para fazer associação com a prática clínica, uma vez que as concentrações testadas são inúmeras vezes inferiores as concentrações estipuladas pelos fabricantes (VIJAYAKUMAR et al., 2018). Contudo, devido a inexistência de métodos específicos e padronizados para avaliar os biocidas, a determinação da CMI pode ser um ponto de partida para avaliar o nível de redução da viabilidade bacteriana perante esses compostos (RUSSELL, 2003a). Além disso, o CIM permite avaliar esses compostos em concentrações residuais que podem permanecer em superfícies, tecidos vivos ou em outros materiais, uma vez que biocidas podem ser mais seletivos em baixas concentrações, gerando assim uma pressão seletiva de cepas multirresistentes (RUSSELL, 2002; THOMAS et al., 2000).

A partir da determinação das duas populações (tipo selvagem e não susceptíveis), com base no valor ECOFF determinado, verificou-se que os isolados de *A. baumannii* foram menos susceptíveis ao CBZ em comparação com a CLX, um fato que também foi constatado por Lin et. al.(2017). A redução de susceptibilidade aos QACs , em particular ao CBZ, em *A. baumannii* também vem sendo muito estudada nos últimos anos (GREGORY A. KNAUF et al., 2018; IVANKOVIĆ; GOIĆ-BARIŠIĆ; HRENOVIĆ, 2017b; LIN et al., 2017; LIU et al., 2017; VIJAYAKUMAR et al., 2016b). Neste trabalho, mais da metade dos isolados foram NS ao CBZ. Um resultado idêntico foi demonstrado por Mahzounieh et al. (2014) em que demonstraram evidências sugestivas de que o CBZ não é um agente desinfetante ideal para ser usado em

UTIs, ao verificarem alta tolerância a esse composto em *A. baumannii* e *P. aeruginosa* provenientes de pacientes infectados. O contato dos pacientes com superfícies, artigos críticos e semicríticos no ambiente hospitalar, cuja a aplicação do CZB não foi adequada, pode ser um meio de propagação de linhagens tolerantes e multirresistentes a antibióticos em pacientes internados no mesmo ambiente. A redução da susceptibilidade ao CBZ pode trazer sérias implicações clínicas, uma vez que esse biocida é amplamente utilizado tanto na desinfecção de superfícies e constitui uma ferramenta bastante útil no controle de IRAs nas instituições de saúde.

A emergência de cepas tolerantes a CLX vem sendo muito citada e descrita em estudos recentes (APISARNTHANARAK et al., 2014; HAYASHI et al., 2017; KAMPF, 2016; LIN et al., 2017). Em um estudo realizado por Lin et. al. (2017), foi verificado que 47% dos isolados clínicos apresentaram susceptibilidade reduzida a CLX e consideraram esse resultado como um grande risco para a saúde pública, uma vez que esse biocida é amplamente utilizado na prevenção de infecções por *A. baumannii* nas instituições de saúde. Em outro estudo, os autores descrevem que a aplicação da CLX na prevenção e controle de IRAS pode não ser tão eficiente, podendo contribuir, inclusive, para uma pressão seletiva sobre esse micro-organismo (LIU et al., 2017). Para Kawamura-Sato et. al. (2008), a exposição repetitiva a concentrações subinibitórias de CLX, pode elevar gradualmente a CMI em cepas com susceptibilidade reduzida. No Brasil, não existem até agora, estudos publicados abordando a tolerância a CLX em *A. baumannii*. Portanto, este estudo pode servir como sentinela para a necessidade de monitoramento de disseminação de cepas de *A. baumannii* multirresistentes e tolerantes a CLX nos hospitais do país, sobretudo na cidade de Natal- RN.

O mecanismo adaptativo comumente associado a tolerância aos biocidas é a expressão de sistemas de bombas de efluxo multidrogas, que também exercem um papel fundamental com relação à resistência bacteriana (RUSSELL, 2002). Portanto nessa pesquisa, foram investigados genes de componentes essenciais das bombas de efluxo adeABC e adeJIK, pertencentes ao sistema RND. Esses genes vem sendo bastantes estudados pelo fato da descrição de evidências da associação entre a resistência aos antibióticos e a redução de susceptibilidade aos biocidas em *A. baumannii* MDR (KAWAMURA-SATO et al., 2010; LIN et al., 2017; RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010). Embora a constatação da alta frequência dos genes *adeB* e *adeJ* nos isolados avaliados nesse estudo, não houve nenhuma

associação estatisticamente significativa com a redução da susceptibilidade aos biocidas testados, uma vez que isolados com CIM baixas para os biocidas também apresentaram os referidos genes. A presença do gene não garante necessariamente sua expressão, uma vez que a expressão desses genes depende do seu sistema regulatório constituído por dois componentes que necessitam ser ativados para possibilitar a indução da expressão das bombas de efluxo em Gram negativos como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (LIN et al., 2017).

Para constatar a interferência dessas bombas de efluxo sobre a ação dos biocidas, seria necessário a pesquisa quantitativa desses genes ou a inativação dos genes *adeB* e *adeJ*, como foi proposto por Lin et. al. (2017). Rajamohan (2010) e Lin (2017) demonstraram que o sistema de Transporte *adeABC* e *adeIJK* podem expulsar e impedir a ação dos biocidas, fornecendo um papel adicional na multirresistência em *A. baumannii*. No entanto, Ferna et. al. (2015) descartaram a relação do *AdeJ* com a redução de susceptibilidade a CLX e ao CBZ, destacando apenas o envolvimento do *AdeB* e a redução de porinas (*OmpA* e *CarO*) nesse processo.

Quanto a pesquisa da bomba de efluxo *QacE*, a sua frequência foi relativamente baixa neste estudo, quando comparada com os demais genes pesquisados, cuja presença foi constatada em apenas 21,48% dos isolados. Um resultado similar foi obtido por Liu et. al. (2017) no qual detectaram a presença do gene *qacE* em 31% dos seus isolados clínicos de *A. baumannii*. Outros autores como Mahzounieh (2014) e Babaei (2015) demonstraram em seus estudos uma alta prevalência do *QacE*, respectivamente, em 40% e 73% dos isolados clínicos de *A. baumannii* com susceptibilidade reduzida ao CBZ e a CLX. A aquisição desse sistema de bombas multidrogas em Gram Negativas, sobretudo em *A. baumannii* através de elementos genéticos móveis vem se tornando cada vez mais descrita em estudos recentes, conferindo assim tolerância aos biocidas (MAHZOUNIEH et al., 2014; GOMAA; HELAL; KHAN, 2017; LIU et al., 2017).

Apesar da baixa frequência do gene *QacE*, foi possível demonstrar estatisticamente uma associação significativa entre a sua presença e a redução de susceptibilidade dos isolados a CLX, uma vez que a sua detecção prevaleceu nos isolados NS a CLX. Essa evidência é importante, uma vez que a presença desse gene, é um indício de aquisição de resistência a CLX em cepas de *A. baumannii* com um perfil de multirresistência aos antibióticos nos hospitais de Natal. Quanto ao CBZ, não houve associação significativa

entre a presença desse gene e a susceptibilidade reduzida a esse composto. Essa evidência também foi descrita por Kucken (2000), ao verificar que patógenos Gram negativos resistentes aos antibióticos não necessariamente são mais resistentes aos QACs em cepas portadoras do gene *qacE*. Contudo, segundo Chapman, (2003), a presença do gene *qacE* pode não suscitar uma falha na desinfecção mas pode certamente aumentar a probabilidade de coresistência.

A correlação entre a resistência aos antibióticos e aos biocidas vem sendo muito discutida e estudada recentemente (GOVINDAN RAJAMOHAN, 2009; KAWAMURA-SATO et al., 2010; TANDUKAR et al., 2013; FERNA; VILA; MARTI, 2015; LIN et al., 2017). O autor A. Russel (1999) já havia suscitado a possibilidade de haver essa correlação desde o início dos anos 2000, ao verificar indícios de que os biocidas podem selecionar cepas resistentes aos antibióticos, sobretudo em Gram negativos. Neste estudo, foi verificada uma associação significativa entre o perfil de resistência aos antibióticos e a redução de susceptibilidade ao CBZ. Segundo Sidhu et al. (2002), a tolerância ao CBZ em isolados resistentes aos antibióticos indica a presença de determinantes seletivos que surgiram do processo de tratamento com antibióticos e da desinfecção do ambiente hospitalar.

Foi verificado também que os isolados resistentes aos aminoglicosídeos foram na sua maioria NS ao CBZ, assim como também foi demonstrado por Kawamura et al. (2010) e Fernandez et al. (2015), sugerindo a possibilidade de coresistência. Além dos aminoglicosídeos, um resultado idêntico também foi observado em relação a ampicilina. Esse fato também foi constatado por Mahzounieh et al. (2017) em cepas de *A. baumannii* e *E. coli* tolerantes ao CBZ. A tolerância ao CBZ em isolados resistentes a penicilinas e tetraciclinas já havia sido relatada por Sidhu et al. (2002). Estes autores sugeriram que isso deve-se a aquisição de plasmídeos abrigando genes de resistência para ambos os agentes antimicrobiano. Esse dado é inquietante, tendo em vista o uso generalizado de CBZ nas instituições de saúde como um agente desinfetante importante no controle e prevenção de infecções por cepas MDRs.

A análise dos resultados deste estudo também permitiu identificar que todas as cepas isoladas de ponta de cateter apresentaram susceptibilidade reduzida a CLX, além de serem multirresistentes. A emergência de cepas de *A. baumannii* MDRs e de MRSA isoladas de ponta de cateter tolerantes aos antissépticos e abrigando genes de QACs vem sendo relatado em alguns estudos (BABAEI et al., 2015; THOMAS; RUSSELL; MAILLARD, 2005). Esse



fato suscita grande inquietação, uma vez que a CLX é amplamente utilizada no processo de descolonização de dispositivos invasivos, como ponta de cateter, como medida de prevenção de infecções de cepas multirresistentes e capazes de desenvolver biofilme em equipamentos e dispositivos presentes no ambiente hospitalar (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014). Portanto, a persistência de cepas isoladas de cateteres com esse perfil de susceptibilidade aos antibióticos, como também a CLX, é um evento que necessita de vigilância e controle nas instituições da saúde, dado que esse composto é amplamente incorporado em planos de desinfecção de equipamentos hospitalares, dispositivos invasivos, além de antissepsia da pele de pacientes e profissionais da saúde, visando reduzir o risco de ocorrência de IRAS.

No tocante ao tipo de hospital e a frequência de cepas com perfil de susceptibilidade reduzida aos biocidas testados, não houve nenhuma associação significativa. Apenas foi possível averiguar que a prevalência de cepas MDRs foi maior no hospital público, que pode estar associado a vários fatores, entre eles, um menor controle no uso de antibióticos, que muitas vezes são utilizados apenas os que se encontram disponíveis no momento e que nem sempre são apropriados para o tratamento para determinada infecção, ocasionando a seleção de cepas MDRs neste ambiente (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; POIREL; NORDMANN, 2006). Outro fator que pode estar associado a isso, é a falha no processo de higienização no ambiente hospitalar, que muitas vezes se encontra relacionado a falta de recursos disponibilizados aos hospitais públicos para o abastecimento de produtos básicos de higiene e de antibióticos. Existe também a falta de conscientização das pessoas (pacientes, profissionais da saúde e visitantes) que circulam nesses ambientes sobre a importância da higienização, sobretudo das mãos, que são os importantes meios de transmissão de micro-organismos, não só nos hospitais públicos, como também nos privados.

A susceptibilidade aos antibióticos e aos biocidas dos isolados bacterianos, apresentado neste estudo, caracteriza o perfil das cepas de *A. baumannii* que se encontram presentes em alguns hospitais do município de Natal. O perfil de redução de susceptibilidade aos biocidas, sugere a necessidade de desenvolver estratégias de monitoramento do uso desses compostos na rotina hospitalar assim como a necessidade de mais estudos investigativos sobre esse fenômeno em cepas de *A. baumannii* que circulam nos hospitais do país, sobretudo no estado do Rio Grande do Norte.

## 7. CONCLUSÕES

Essa pesquisa permitiu concluir que:

- Os isolados bacterianos avaliados neste estudo são resistentes a grande parte dos antibióticos testados os quais são utilizados com frequência na rotina hospitalar, em particular aos  $\beta$ -lactâmicos.

- O teste fenotípico de sinergismo de disco com EDTA permitiu identificar cepas produtoras de metalobelactamases, contudo não se mostrou muito eficaz, uma vez que cepas que foram positivas para o teste, não abrigavam genes que codificam essas enzimas mostrando que os métodos moleculares são essenciais para a obtenção de resultados conclusivos.

- Um grande número de isolados bacterianos apresentaram redução na susceptibilidade aos biocidas testados, em especial ao cloreto de benzalcônio. Esse fato demonstra que baixas concentrações deste composto pode permitir a persistência e a sobrevivência de cepas multirresistentes e consequentemente a disseminação no ambiente hospitalar.

- O gene de resistência aos carbapenêmicos mais prevalente foi o gene *bla*<sub>OXA-23</sub>.

- O gene *qacE* pode ter contribuído para a redução de susceptibilidade a Clorexidina, uma vez que a maioria das cepas tolerantes a esse biocida, abrigava esse gene.

- A redução de susceptibilidade ao Cloreto de Benzalcônio pode estar relacionada com a presença de multirresistência aos antibióticos testados.

- A prevalência de cepas multirresistência foi maior no hospital público, o que pode demonstrar maiores falhas no processo de controle e uso de antibióticos.

## 8. REFERÊNCIAS

ABU-QATOUSEH, L.; MATAKA, K. Value of phenotypic and genotypic identification of *Acinetobacter baumannii* isolates from two hospitals in Jordan. **THE INTERNATIONAL ARABIC JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS**, n. December, 2014.

AKERS, K. S. et al. Tetracycline Susceptibility Testing and Resistance Genes in Isolates of *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* Complex from a U . S . Military Hospital. v. 53, n. 6, p. 2693–2695, 2009.

AKERS, K. S. et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii*-*calcoaceticus* complex. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1132–1138, abr. 2010.

ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp . as nosocomial pathogens : Epidemiology and resistance features. **SAUDI JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES**, 2016.

ÁLVAREZ-BUYLLA, A.; CULEBRAS, E.; PICAZO, J. J. Infection , Genetics and Evolution Identification of *Acinetobacter* species : Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques ? **infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 345–349, 2012.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1–29, 2017.

ANVISA. **Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo1/lactamicos2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/lactamicos2.htm)>.

ANVISA. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. **Microbiologia Clínica para o controle da infecção relacionada à assistência em saúde**, p. 1–154, 2013a.

ANVISA. Nota técnica nº 01/2013. p. 1–22, 2013b.

ANVISA. Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. **Agencia Nacional Da Vigilancia Sanitaria**, n. 1, p. 1–21, 2015.

ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. **ANVISA**, v. 16, p. 83, 2016.

APISARNTHANARAK, A. et al. Increase in Chlorhexidine Minimal Inhibitory Concentration of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates after Implementation of Advanced Source Control. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 01, p. 98–99, 2014.

ARVANEH, Z.; MAHZOUNIEH, M.; LOTFALIAN, S. Antibiotic Resistance Induction by

Benzalkonium Chloride Exposure in Nosocomial Pathogens. v. 4, n. 2, 2017.

ASIF, M.; ALVI, I. A.; REHMAN, S. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1249–1260, 2018.

ASKOURA, M. et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal of Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2011.

BABAEI, M. R. et al. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 1–5, 2015.

BENJAMIN A. EVANS, S. G. B. A. OXA Beta-Lactamases. **JOURNAL OF AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY**, v. 27, n. 2, p. 241–263, 2014.

BOGAERT, P. et al. Could *Acinetobacter pittii* act as an NDM-1 reservoir for enterobacteriaceae? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 10, p. 2414–2415, 2013.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* a. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228–240, 1986.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. MINIREVIEW Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: Clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1607–1615, 2012.

CAMARENA, L. et al. Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000834, 1 abr. 2010.

CAMUS, C. et al. Decline of multidrug-resistant Gram negative infections with the routine use of a multiple decontamination regimen in ICU. **Journal of Infection**, v. 73, n. 3, p. 200–209, 2016.

CANEIRAS, C. et al. First Description of Colistin and Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing KPC-3 Carbapenemase in Portugal. **Antibiotics**, v. 7, n. 4, p. 96, 2018.

CAY, P. H. M.; OCAMPO-SOSA, A. A.; FLEMING, G. T. A. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. **Microbiology**, n. May, p. 30–38, 2010.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271–276, 2003.

CHEN, Y. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. n. September 2010, p. 1255–1259, 2011.

CHEN, Y. et al. High prevalence and clonal dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital: a cross sectional study. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–11, 2018.

CHOI, C. H. et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1127–1138, ago. 2005.

CORDEIRO, F. et al. Original article Clinical and microbiological characteristics of *baumannii* in ICU patients at a teaching hospital . **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 556–563, 2016.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. **Metallo- $\beta$ -lactamases: A last frontier for  $\beta$ -lactams?** **The Lancet Infectious Diseases**, 2011.

CORNELIS, P. *Acinetobacter* Molecular Biology. **Systematic Biology**, p. 65–86, 2008.

COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688 , a Class 1 Integron with Two New Gene Cassettes , *cmlA2* and *qacF*. v. 42, n. 10, p. 2557–2563, 1998.

COURVALIN, P.; PE, B. MINIREVIEW Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp . 2 Se. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 55, n. 3, p. 947–953, 2011.

DALLA-COSTA, L. M. et al. Outbreak of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme in Curitiba , Brazil. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 41, n. 7, p. 3403–3406, 2003.

DENG, M. et al. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *acinetobacter baumannii* from a chinese university hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 297–303, 2014.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 939–951, 2007.

DOUGHARI, H. J. Minireview The Ecology , Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp .: An Overview. **Microbes Environments**, v. 26, n. 2, p. 101–112, 2011.

EBSERH. Higienização Hospitalar. 2017.

ECHENIQUE, J. R. et al. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 23, p. 7670–7679, 1992.

EDELSTEIN, P. Epidemiologic Cutoff Value. p. 2017, 2017.

EL-MAHDY, T. S. et al. Detection of blaOXA-23-like and blaNDM-1 in *Acinetobacter baumannii* from the Eastern Region, Saudi Arabia. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 23, n. 1, p. 115–121, 2017.

ESPINAL, P. et al. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* ( Ab ) group by MALDI-TOF MS. **New Microbes and New Infections**, v. 18, n. 11, p. 1097–1103, 2011.

FAKAN, F. et al. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 36, n. 3, p. 94–98, 2000.

FDA. **FDA-Identified Interpretive Criteria**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/ucm587585.htm>>.

FERNA, F.; VILA, J.; MARTI, L. Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding. **J Antimicrob Chemother**, n. September, p. 3222–3229, 2015.

FISHBAIN, J.; PELEG, A. Y. Treatment of *Acinetobacter* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. Table 1, p. 79–84, 2010.

FRIEDMAN, E. B. B. H.; BENDINELLI, M. **Acinetobacter Biology and Pathogenesis**. Eugenie Be ed. Pisa, ITALY: [s.n.].

GADDY, J. A. et al. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. **Infection and immunity**, v. 80, n. 3, p. 1015–1024, mar. 2012.

GALES, A. C. et al. The Worldwide Panorama of *Acinetobacter baumannii* Group and *Stenotrophomonas maltophilia* in the Last 20 Years: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program ( 1997 – 2016 ). **ECCMID**, p. 2018, 2018.

GEISINGER, E.; ISBERG, R. R. Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 2, p. e1004691, fev. 2015.

GHAIMA, K. K. Distribution of extended spectrum beta-lactamase ( ESBL ) genes

among *Acinetobacter baumannii* isolated from burn infections. **MOJ Cell Sci Rep**, v. 5, n. 2, p. 42–46, 2018.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 703–715, 2005.

GOMAA, F. A. M.; HELAL, Z. H.; KHAN, M. I. High Prevalence of blaNDM-1, blaVIM, qacE, and qacED1 Genes and Their Association with Decreased Susceptibility to Antibiotics and Common Hospital Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Microorganisms**, v. 5, p. 1–15, 2017.

GOVINDAN RAJAMOHAN, V. B. S. AND W. A. G. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides in mediating decreased susceptibility to biocides. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. December, p. 228–232, 2009.

GREGORY A. KNAUF, A. et al. Exploring the Antimicrobial Action of Quaternary Amines against. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

GUO, W. et al. Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. **Pathogens and global health**, v. 109, n. 4, p. 184–192, 2015.

GUSATTI, C. DE S. et al. FIRST OCCURRENCE OF BLAOXA-58 IN *ACINETOBACTER BAUMANNII* ISOLATED FROM A CLINICAL SAMPLE IN SOUTHERN BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 1517–8382, p. 243–246, 2012.

HAMIDIAN, M.; HALL, R. M. ISAb1 targets a specific position upstream of the intrinsic ampC gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. June, p. 2682–2683, 2013.

HAMMERUM, A. M. et al. Investigation of a possible outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Odense, Denmark using PFGE, MLST and whole-genome-based SNPs. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, n. March, p. 1965–1968, 2015.

HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin Susceptibility of capsular *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, triclosan and cationic biocides. n. 2001, p. 695–696, 2004.

HARBARTH, S. et al. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)>.

HASSAN, K. A. et al. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. v. 110, n. 50, p. 1–6, 2013.

HAYASHI, M. et al. Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* international clone II. **Journal of Hospital Infection**, 2017.

HOPE, C. K.; WILSON, M. Analysis of the Effects of Chlorhexidine on Oral Biofilm Vitality and Structure Based on Viability Profiling and an Indicator of Membrane Integrity. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 48, n. 5, p. 1461–1468, 2004.

HSUEH, P. et al. Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Blood Isolates of *Acinetobacter* Species. v. 52, n. 8, p. 3095–3100, 2014.

HUA, Y. et al. Phage Therapy as a Promising New Treatment for Lung Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Mice. v. 8, n. January, p. 1–11, 2018.

IVANKOVIĆ, T.; GOIĆ-BARIŠIĆ, I.; HRENOVIĆ, J. Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. **Arh Hig Rada Toksikol**, p. 99–108, 2017a.

IVANKOVIĆ, T.; GOIĆ-BARIŠIĆ, I.; HRENOVIĆ, J. Reduced susceptibility to disinfectants of *Acinetobacter baumannii* biofilms on glass and ceramic. p. 99–108, 2017b.

JACOBS, A. C. et al. Inactivation of Phospholipase D Diminishes. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 78, n. 5, p. 1952–1962, 2010.

JAGLIC, Z.; CERVINKOVA, D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - The *qac* genes and their role: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n. 6, p. 275–281, 2012.

JEONG, S. et al. Identification of *Acinetobacter* Species Using Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **Clinical Microbiology**, v. 5, p. 325–334, 2016.

JEUNE, L.; GALL-DAVID, S. LE; BONNAURE-MALLET, M. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. **J Antimicrob Chemother** 2012;, v. 67, n. August 2012, p. 2837–2842, 2018.

JIN, J. S. et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17027, fev. 2011.

JOSHI, P. R. et al. Co-existence of *bla* OXA-23 and *bla* NDM-1 genes of *Acinetobacter baumannii* isolated from Nepal: antimicrobial resistance and clinical significance. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 21, 2017.

KAMPF, G. Acquired resistance to chlorhexidine – is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative? **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 3, p. 213–227, 2016.



KARAGEORGOPOULOS, D. E. et al. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant ( including carbapenem-resistant ) *Acinetobacter* infections : a review of the scientific evidence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. April, p. 45–55, 2008.

KARAH, N. et al. Database for the ampC alleles in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS ONE**, p. 1–12, 2017.

KARINA, A. et al. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 5, p. 396–401, 2012.

KARMOSTAJ, A.; PEERAYEH, S. N.; SALMANIAN, A. H. Emergence of tigecycline resistant *acinetobacter baumannii* from an Intensive Care Unit (ICU) in Tehran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 215–219, 2013.

KAWAMURA-SATO, K. et al. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 568–576, 2008.

KAWAMURA-SATO, K. et al. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. **J Antimicrob Chemother**, n. June, p. 1975–1983, 2010.

KHAN, A. U.; MARYAM, L.; ZARRILLI, R. **Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health****BMC Microbiology**, 2017.

KRISHNAMOORTHY, S. et al. Microbicides alter the expression and function of RND-type efflux pump AdeABC in biofilm-associated cells of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 57–63, 2016.

KULKARNI, S. S. et al. Identification of genus *Acinetobacter* : Standardization of in - house PCR and its comparison with conventional phenotypic methods. **Journal of Laboratory Physicians**, p. 2017–2020, 2017.

KUMAR, V. et al. In vitro susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates to common biocides. **Int. J. Res. Pharm. Sci. ©JK Welfare & Pharmascope Foundation | International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 110–116, 2016.

LAVILLA LERMA, L. et al. Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. **Food Microbiology**, v. 51, p. 33–44, 2015.

LEE, C.-R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. March, 2017.

LEE, Y. et al. first identification of bla OXA-51-like in Non- baumannii Acinetobacter spp . **Journal of Chemotherapy**, v. 21, p. 514–520, 2009.

LEE, Y. et al. Emergence of Carbapenem-Resistant Non- baumannii Species of Acinetobacter Harboring a bla OXA-51 -Like Gene That Is Intrinsic to. p. 1124–1127, 2012.

LEPAINTEUR, M. et al. Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: The creeping threat? **Journal of Hospital Infection**, v. 83, n. 4, p. 333–336, 2013.

LESKI, T. A.; JIMMY, D. H. bla DIM-1 , and bla VIM Carbapenemase Genes in Hospital Enterobacteriaceae Isolates from Sierra. **Journal of Chemotherapy**, 2013.

LIN, F. et al. Molecular Characterization of Reduced Susceptibility to Biocides in Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. September, 2017.

LIN, M. et al. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of Acinetobacter baumannii adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

LIRA, F. et al. Emergence of extensively drug-resistant OXA-72 – producing Acinetobacter baumannii in Recife , Brazil: risk of clonal dissemination ? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 250–251, 2013.

LISBOA, L. et al. Original article Detection of bla OXA-23 in Acinetobacter spp . isolated from patients of a university hospital. **The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES** [www.elsevier.com/locate/bjid](http://www.elsevier.com/locate/bjid) **Original**, v. 6, n. 6, p. 521–526, 2012.

LITAKE, G. M. et al. Phenotypic ESBL Detection in Acinetobacter baumannii : A Real Challenge. **American Journal of Infectious Diseases Original**, 2015.

LIU, W. J. et al. Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 13–17, 2017.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in Acinetobacter baumannii. p. 119–127, 2014.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3375–3380, 2001.

MAHZOUNIEH, M. et al. Detection of Antiseptic-Resistance Genes in Pseudomonas and Acinetobacter spp . Isolated From Burn Patients. **Jundishapur J Nat Pharm Prod**, v. 9, n. 2, p. 1–4, 2014.

MALEKI, M. H. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of tetracycline resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from nosocomial infections at Tehran hospitals. **Iran J Basic Med Sc**, v. 17, n. 1, 2014.

MANIAN, F. A. et al. Isolation of *Acinetobacter baumannii* Complex and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Hospital Rooms Following Terminal Cleaning and Disinfection : Can We Do Better ? v. 32, n. 7, p. 667–672, 2014.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. Antimicrobial Resistance: *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 8, p. 1254–1263, 2008.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MOHAJERI, P. et al. The Prevalence of ESBL Isolates of *Acinetobacter baumannii* Using Pulsed- Field Gel Electrophoresis. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences Journal homepage: www.zjrms.ir The**, p. 20–23, 2011.

MONTEFOUR, K. *Acinetobacter baumannii*: An emerging Multi-drug Resistant Pathogen in Critical Care. **Care Nurse**, 2008.

MUÑOZ-GALLEGO, I. et al. **Chlorhexidine and mupirocin susceptibilities in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bacteraemia and nasal colonisation** **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. [s.l: s.n.].

MUSSI, A. et al. CarO , an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance , is essential for L -ornithine uptake. **FEBS Letters**, v. 581, p. 5573–5578, 2007.

NARANJO, J. D. et al. Control of a Clonal Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Hospital of the Basque Country after the Introduction of Environmental Cleaning Led by the Systematic Sampling from Environmental Objects. v. 2013, n. September 2010, 2013.

NAVON-VENEZIA, S.; LEAVITT, A.; CARMELI, Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 772–774, 2007.

NOWAK, J.; SEIFERT, H.; HIGGINS, P. G. Prevalence of eight resistance-nodulation-division efflux pump genes in epidemiologically characterized *Acinetobacter baumannii* of worldwide origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 630–635, 2015.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. n. December, 2014.

ORTEGA MORENTE, E. et al. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of**

**Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 13–25, 2013.

OWLIA, P. et al. ESBL- and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. **Le Infezioni in Medicina**, p. 182–187, 2012.

PAGANO, M. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 444–445, 2015.

PAL, N.; SUJATHA, R.; KUMAR, A. Phenotypic and Genotypic Identification of *Acinetobacter baumannii* with Special Reference to *Bla oxa-51* Like Gene and its Antimicrobial Susceptibility Pattern from Intensive Care Units in Kanpur. **International Journal of Contemporary Medical Research**, v. 4, n. 5, p. 1154–1158, 2017.

PASTERAN, F. et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. **J Antimicrob Chemother** 2012, p. 1795–1797, 2010.

PAVONI, T. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil ( 2008 – 2011 ): countrywide spread of OXA-23 – producing clones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 468–472, 2014.

PECK, K. R. et al. In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* , including colistin- or tigecycline-resistant isolates. **Journal of Medical Microbiology**, n. May, p. 353–360, 2017.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii* : Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

PFEIFER, Y. et al. Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2016.0059, 2016.

PIANA, A. et al. Molecular typing of XDR *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian ICU Caratterizzazione molecolare di *Acinetobacter baumannii*. v. 39, n. 4, p. 129–133, 2015.

PICA, R. C.; CARDOSO, J. P.; GALES, A. C. OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: a case report ´. **J Antimicrob Chemother**, p. 452–454, 2011.

PILLONETTO, M. et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7592–7594, 2014.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 1, p. 119–123, 2011.

POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* : mechanisms and epidemiology. 2006.

PRAG, G. et al. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 122, n. 10, p. 961–967, 2014.

QUALE, J. et al. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Endemic in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 2, p. 214–220, 2003.

QUEZADA, T. N. et al. Outbreak of bla OXA-72 -producing *Acinetobacter baumannii* in South America. **Journal of Chemotherapy**, v. 9478, n. April, 2016.

RAJAMOHAN, G.; SRINIVASAN, V. B.; GEBREYES, W. A. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. **J Antimicrob Chemother**, n. December 2009, p. 228–232, 2010.

RIBERA, A. et al. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 477–480, set. 2003.

RIBERA, A.; RUIZ, J.; VILA, J. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2310–2312, jul. 2003.

ROCHA, L. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil : susceptibility profile and diversity of oxacillinases. **J Bras Patol Med Lab**, n. December, p. 358–361, 2017.

RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* . Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 3, p. 327–333, 2018.

ROZALES, F. P. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, 2014.

RUSSELL, A D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. **Journal of applied microbiology**, v. 83, n. 2, p. 155–65, 1997.

RUSSELL, A. D. JAC Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants : an increasingly important area of investigation. p. 597–599, 2002.

RUSSELL, A. D. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 794–803, 2003a.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to

biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 750–763, 2003b.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics , disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. p. 97–104, 2004.

RUSSELL, A. D.; I, C. C. F. Bacterial resistance present knowledge to disinfectants : and future problems. **journal of Hospital infection**, v. 43, n. 1 998, p. 57–68, 1999.

RUSSELL, A. D.; MCDONNELL, G. Concentration : a major factor in studying biocidal action. p. 1–3, 2000.

SANTOS, N. DE Q. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** [s.l: s.n.].

SEGAL, H.; GARNY, S.; ELISHA, B. G. Is ISABA-1 customized for Acinetobacter? **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 2, p. 425–429, 2005.

SOCIETY, T. P.; BRITAIN, G. Do antiseptics and disinfectants select for anti biotic. **Journal .Med. Microbiol.**, v. 48, n. May, p. 613–615, 2017.

SOHAIL, M. et al. Major Article Antimicrobial susceptibility of Acinetobacter clinical isolates and emerging antibiogram trends for nosocomial infection management. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. May, p. 300–304, 2016.

SRINIVASAN, V. B.; VENKATARAMAIAH, M.; MONDAL, A. Functional Characterization of AbeD , an RND-Type Membrane Transporter in Antimicrobial Resistance in Acinetobacter baumannii. p. 1–17, 2015.

SU, X.-Z. et al. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled Acinetobacter baumannii multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4362–4364, out. 2005.

TANDUKAR, M. et al. Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 17, p. 9730–9738, 2013.

TANNENBAUM, T. et al. Management of a hospital outbreak of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii using a multimodal intervention including daily chlorhexidine baths. **Journal of Hospital Infection journal**, v. 93, 2016.

TEREZA, A. et al. The changing epidemiology of Acinetobacter spp . producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil : a BrasNet report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 0, p. 8–11, 2015.

THOMAS, L. et al. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in Pseudomonas aeruginosa and the effect of a ‘ residual ’ concentration. **Journal of Hospital Infection**, v. 46, p. 297–303, 2000.

THOMAS, L.; RUSSELL, A. D.; MAILLARD, J. Y. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 533–543, 2005.

TOWNER, B.-B. A. K. J. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 9, n. 2, p. 148–165, 1996.

TURTON, J. F. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the bla OXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2974–2976, 2006a.

TURTON, J. F. et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMSEMS**, v. 258, n. Table 1, p. 72–77, 2006b.

VALI, L. et al. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 524–532, 2008.

VIEIRA, P.; PICOLI, S. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151–156, 2015.

VIGIL, N. N. D. E.; SANIT, N. Segurança do paciente em serviços de saúde : limpeza e desinfecção de superfícies. 2012.

VIGIL, P. U. D. E.; SA, N. E. M.; HOSPITALAR, Q. Limpeza e Desinfecção de Superfícies. **Ebserh**, 2017.

VIJAYAKUMAR, R. et al. Determination of Minimum inhibitory concentrations of Common Biocides to Multidrug-Resistant Gram-negative bacteria. **Applied Medical Research**, v. 2, n. 3, p. 56, 2016a.

VIJAYAKUMAR, R. et al. Determination of minimum inhibitory concentrations of common biocides to multidrug-resistant gram-negative bacteria. v. 2, n. 3, 2016b.

VIJAYAKUMAR, R. et al. Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* — A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. **Journal of Infection and Public Health**, 2018.

VIJAYAKUMAR, R.; ABOODY, M. S. A.-. Determination of Minimum inhibitory concentrations of Common Biocides to Multidrug-Resistant Gram-negative bacteria Determination of minimum inhibitory concentrations of common biocides to multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Applied Medical Research**, n. October, 2016.

VILA, J. et al. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 757–

762, jun. 1997.

VOLKERS, G. et al. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. **FEBS Letters**, v. 585, n. 7, p. 1061–1066, 2011.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. n. January, p. 373–383, 2006.

WAND, M. E. **Bacterial Resistance to Hospital Disinfection**. [s.l: s.n.].

WEINSTEIN, R. A. et al. Chlorhexidine: Expanding the Armamentarium for Infection Control and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 274–281, 2008.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Biocides , drug resistance and microbial evolution. p. 313–317, 2001.

WHO, C. D. OF. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 7 jun. 2017.

WONG, E. W. et al. Disruption of adeB gene has a greater effect on resistance to meropenems than adeA gene in *Acinetobacter* spp. isolated from University Malaya Medical Centre. **Singapore Medical Journal**, v. 50, n. 8, p. 822–826, 2009.

WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 4, p. 351–353, 3 dez. 2006.

WU, G. et al. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. **The Journal of Antibiotics** (, n. March, p. 1–5, 2015.

XIE, R. et al. Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. **Emerging Microbes & Infections**, 2018.

YILDIZ, S. S. PERFORMANCE OF CARBANPAND CIM TESTS IN OXA-48 CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 64, n. 1, p. 9–16, 2017.

ZENATI, K. et al. Characterization of NDM-1- and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in a hospital environment in Algeria. **Journal of Hospital Infection**, v. 92, n. 1, p. 19–26, 1 jan. 2016.

ZHANG, R. et al. Emergence of NDM-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. isolated from China. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 853–860, 2014.




ZHOU, H. et al. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAbal-blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1076–1080, 2007.

ZWALUW, K. VAN DER et al. The Carbapenem Inactivation Method ( CIM ), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. **PLoS ONE**, n. Cim, p. 1–13, 2015.

## 9. APÊNDICE

## 9.1. APÊNDICE A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA APROVAÇÃO DO ESTUDO

 **MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

**PARECER Nº 017/2013**

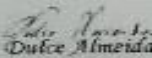
<b>Assunto</b>	Consulta
<b>Projeto de Pesquisa</b>	Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes de amostras de <i>Acinetobacter</i> spp. provenientes de pacientes infectados e ambiente hospitalar
<b>Pesquisadora responsável</b>	Maria Celeste Nunes de Melo
<b>Revisão ética em</b>	27 de setembro de 2013

Em atenção à sua consulta sobre a necessidade de submeter à Plataforma Brasil o projeto intitulado "Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes de amostras de *Acinetobacter* spp. provenientes de pacientes infectados e ambiente hospitalar", esclarecemos que são consideradas como pesquisa envolvendo o ser humano aquelas que:

[...] individual ou coletivamente, tenha como participante o ser humano, em sua totalidade ou partes dele, e o envolva de forma direta ou indireta, incluindo o manejo de seus dados, informações ou materiais biológicos (Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde).

Queremos frisar que se alguma informação associada ao paciente, de cujas amostras biológicas foram isoladas a citada bactéria, for usada como dado para o trabalho de pesquisa, o pesquisador deverá submeter o projeto de pesquisa, como protocolo de pesquisa, à Plataforma Brasil, para avaliação ética do mesmo por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Natal, 01 de outubro de 2013.

  
**Dulce Almeida**  
Coordenadora do CEP-UFRN

Comitê de Ética em Pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, Brasil - CEP 59078-970  
fone/fax: (84) 3215-3135 - e-mail: cepufm@reitoria.ufrn.br - site: <http://www.etica.ufrn.br>  
1/1

## 9.2. APENCICE B - DADOS DOS ISOLADOS ESTUDADOS

Figura 12- Quadro de dados dos isolados clínicos estudados e os resultados da pesquisa realizada.

Isolados	Sitio de isolamento	Hospital	CIM (Mg/ml)		ANTIBIOGRAMA														GENES PESQUISADOS													
			CLX	CBZ	GEN	AMI	CIP	CTX	CRO	CAZ	CPM	PIT	SUT	APS	IMP	MEN	TGC	TET	MBL	Vim-1	Imp-1	Ndm-1	Oxa-51	Oxa-23	Oxa-58	Oxa-24	Oxa-143	QacE	AdeB	AdeI		
SLH 270	Sec. De trocantérica	A	4	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+			
SLH 5575	Sangue	A	4	8	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+		
SLH 75	Sangue	A	32	8	S	S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+		
SLH Luiz	Sangue	A	16	16	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+		
SLS 150	Sec. De F. O.	A	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+		
SLS 1939	Sem dados	A	4	32	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-		
SLS 1949	Sec. Traqueal	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+		
SLS 236	Líquido pleural	A	32	8	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+		
SLS 307.2	Sec. De F. O.	A	16	8	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+		
SLS 4706.1	Sec. Úlcera	A	16	8	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+		
SLS 4846	Sec. Traqueal	A	16	32	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	S	R	-	*	*	*	+	-	-	-	-	-	+	+		
SLS 4917	Swab de empiema	A	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+		
SLS 5106. 02	Sec. Traqueal	A	16	32	S	S	R	R	R	R	I	R	S	I	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+		
SLS 5111	Sec. Traqueal	A	16	64	S	S	R	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+		
SLS 6190	P. De cateter	A	32	32	S	S	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+		
SLU 6454	Urina	A	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+		
HCH 511	Sangue	B	16	16	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+		
HCH 544	Sangue	B	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+		
HCS 107.1	Sec. De escarro	B	16	32	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+		
HCS 113	Sec. Traqueal	B	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	+	+	+		
HCS 139	Sec. Traqueal	B	32	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+		

HCS 189	Sec. De F. O.	B	16	32	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
HCS 219	Sec. Traqueal	B	16	16	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
HCS 360	Liquido ascético	B	16	16	S	S	R	R	R	R	I	R	S	I	R	R	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCS 363	Sec. Traqueal	B	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
HCS 418	Sec. De F. O.	B	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCU 191	Urina	B	16	16	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HM 128.1	Fragmento de tecido	C	16	32	I	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
HM 128.2	Sec. De fêmur	C	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
HM 152.2	Sec. Traqueal	C	16	16	S	S	R	R	R	I	I	R	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
HM 228	Sec. De quadril	C	16	16	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HM 236.2	Sec. De fêmur	C	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HM 243	Sec. De tecido da coxa	C	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
HM 301.1	Sec. Sacral	C	64	16	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	I	R	S	R	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
HM 316	Sec. De perna	C	16	32	I	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
HM 487	Sec. Traqueal	C	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	I	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
HM 551	Sangue	C	32	32	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
HM 84	Sangue	C	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
HM 92	Sec. De pino intraósseo	C	16	32	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
H. 256	Sangue	D	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
L.118	Lcr	D	16	16	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S. 325	Sec. Traqueal	D	32	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+
S.205	Cisto pancreático	D	8	16	S	S	R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	S	I	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+
S.210	Sec. Nasal	D	16	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.251	Sangue	D	8	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
S.41	Sec. Traqueal	D	8	8	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.412	Aspirado traqueal	D	8	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.44	Sec. Traqueal	D	8	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.55	Sec. Traqueal	D	16	4	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.695	Fragmento de tecido	D	8	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-

S.77	Sec. Traqueal	D	8	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.91	Sec. Traqueal	D	16	64	S	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	+	+	+
S.92	Sec. Traqueal	D	8	16	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
SLH 1562	Sangue	A	32	64	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
SLH 42	Sangue	A	4	16	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	+	-	-	+
SLH 5376	Sangue	A	16	16	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLH 6530.2	Sangue	A	4	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 1919	Sec. Traqueal	A	4	8	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 1945	Sec. Traqueal	A	2	4	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S		S	I	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
SLS 248.2	Sec. Traqueal	A	16	16	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLS 28	Lavado brônquio	A	16	16	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	-	+
SLS 47	Sec. De calcâneo	A	16	32	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLS 4753	Sec. Traqueal	A	32	32	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	+	+	+
SLS 4757. 2	Sec. De ulcera	A	32	64	S	S	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
SLS 5030.2	Sec. Traqueal	A	4	16	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	I	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
SLS 5575	Sangue	A	16	32	S	S	S	I	I	S	R	S	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
HCH 561	Sangue	B	16	32	S	S	S	R	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	-	+
HCH 565	Sangue	B	16	16	S	S	S	R	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7641	Sangue	B	16	16	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7687	Sangue	B	32	16	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7688	Sangue	B	16	16	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	-	-
HCH 7716	Sangue	B	16	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7717	Sangue	B	16	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7751	Sangue	B	16	16	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7755	Sangue	B	16	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCH 7761	Sangue	B	16	16	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	-	+
HCH 7775	Sangue	B	16	16	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
HCS 400	Sec. De F. O.	B	16	16	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HCS 482	Sec. Traqueal	B	16	16	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
HCS 548	Lcr	B	16	32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+

HCS 8479	Sec. Traqueal	B	16	16	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
HCS 8522	Sec. Traqueal	B	16	16	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
HCU 6058	Urina	B	32	16	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
HM 161	Sec. De quadril	C	16	8	S	S	S	R	R	I	S	S	I	S	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
HM 204	Urina	C	32	32	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
HM 242	Sec. De úmero	C	16	8	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
HM 494	P. De cateter	C	32	32	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	+	+	+
HM 59	Sangue	C	16	16	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	-	+
H 626	Sangue	D	16	16	S	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
L.30	Lcr	D	8	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S. 59	Sec. Traqueal	D	8	32	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
S.160	Sec. Traqueal	D	8	16	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.377	Sec. De vesícula	D	8	16	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
SLH 5948	P. De cateter	A	32	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
SLH VAL	Sangue	A	32	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 228	Sec. De F. O.	A	16	32	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
SLS 246	Sec. Traqueal	A	16	64	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	+	-	+	+
SLS 333	Sec. Traqueal	A	16	32	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	-	*	*	*	+	+	-	-	+	-	+	+
SLS 4445	Sec. Traqueal	A	32	16	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
SLS 4477	Sec. De mão	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLS 4711	Sec. Traqueal	A	32	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	-	*	*	*	+	+	-	-	-	+	+	+
SLS 4742	Sec. Traqueal	A	64	32	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
SLS 4756.1	Sec. De ulcera	A	16	64	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 4842	Sec. Gastroenterite	A	16	16	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 4915	Sec. Traqueal	A	16	16	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
SLS 5020	Sec. Traqueal	A	16	16	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 5097.2	Sec. De Gastroenterite	A	16	32	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 5281	Sec. De F. O.	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 530	Fragmento de tecido	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+

SLS 5433.2	Swab sacral	A	16	8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLS 5544	Sec. Traqueal	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
SLS 5562.2	Sec. De F. O.	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	+	+	+
SLS 5595	Sec. de tocanterica	A	16	16	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
SLS 5601	Sec. de escarro	A	16	32	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	+	+	+
SLS 63	Sangue	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
SLS 6571	Urina	A	16	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
SLS 6852	Urina	A	8	16	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLS Luiz	Sec. Traqueal	A	8	16	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
SLS TER	Sec. de osteomielite	A	8	32	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
SLS VAL	Sec. De ulcera	A	32	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
SLU 236	Urina	A	8	32	R	S	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	S	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
SLU 6506	Urina	A	16	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
SLU 6580	Urina	A	16	16	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
SLU 6813	Urina	A	4	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
HCS 437	Sec. Traqueal	B	32	16	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	-	+
HCU 06	Urina	B	16	16	I	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	+	-	+
HCU6093	Urina	B	16	16	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
HM 205	Sangue	C	16	32	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HM 206	Sangue	C	16	32	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	*	*	*	*	+	*	*	*	*	-	+	+
HM 25	Sec. De perna	C	64	32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
S.117	Sec. De abscesso hepático	D	32	32	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.124	Aspirado traqueal	D	32	64	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
S.140	Sec. Traqueal	D	32	32	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
S.196	P. De cateter	D	32	32	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
S.715	P. De cateter	D	32	32	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	-	*	*	*	+	+	-	-	-	-	+	+

Legenda: S: sensível, I: intermediário; R: resistente; \* Não Realizado; Sec: secreção; F.O.: Ferida Operatória; Lcr: Liquor crânio encefálico;

